

MTA Doktori Értekezés Tézisei

**Molekuláris mechanizmusok a
hormonrendszer daganataiban**

**Dr. Patócs Attila
Semmelweis Egyetem
Laboratóriumi Medicina Intézet**



Budapest, 2017

Tartalomjegyzék (I-II. old.):

1.	BEVEZETÉS	3. old.
2.	CÉLKITŰZÉSEK	6. old.
3.	BETEGEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	7. old.
3.1.	Betegek és egészséges egyének	7. old.
3.1.1.	Örökletes endokrin tumorszindrómákban szenvedő betegek	7. old.
3.1.2.	Sporadikus, jóindulatú mellékvesekéreg adenómával diagnosztizált betegek	7. old.
3.1.3.	Hormonvizsgálatok	7. old.
3.2.	Daganatszövetek	7. old.
3.2.1.	Hipofízis daganatok	7. old.
3.2.2.	Mellékvesekéreg rák szövetmintái	8. old.
3.2.3.	Mellékpajzsmirigy daganatok	8. old.
3.3.	Molekuláris genetikai módszerek	8. old.
3.3.1.	Örökletes genetikai eltérések vizsgálatához alkalmazott módszerek	8. old.
3.3.2.	A <i>C4B</i> és a <i>CYP21A2</i> gének kópiaszám és a <i>CYP21A2</i> gén szekvenálása	8. old.
3.3.3.	A glükokortikoid receptor (<i>GR</i>) génvariánsok vizsgálata	9. old.
3.3.4.	A <i>GR</i> génexpressziós vizsgálata	9. old.
3.3.5.	A circadián génexpresszió vizsgálata H295R mellékvesekéreg sejtvonalban	9. old.
3.3.6.	Glükokortikoid receptor béta izoformát (<i>GRβ</i>) expresszáló sejtvonal létrehozása	9. old.
3.3.7.	A sejtciklus dependens gén és mikroRNS expresszió vizsgálatban használt sejtenyészetek	9. old.
3.3.8.	Nagyátersztőképeségű mRNS és mikro-RNS expressziós mérések	9. old.
3.3.9.	Egyedi génexpressziós mérések validálása kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)	10. old.
3.3.10.	Egyedi mikro-RNS expresszió mérés kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)	11. old.
3.4.	Áramlási citométerrel végzett mérések	11. old.
3.4.1.	Apoptózis, sejtciklus-disztribúciós és sejtproliferációs vizsgálatok	11. old.
3.4.2.	Sejtciklus szerinti sejtválogatás fluoreszcencia alapján áramlási citométerrel	12. old.
3.5.	Glükokortikoid receptor béta izoformát (<i>GRβ</i>) expresszáló sejtek szteroid érzékenysége vizsgálat	12. old.
3.6.	A <i>WEE1</i> 3'UTR feltételezett mikro-RNS kötőhelyének vizsgálata	12. old.
3.7.	Fehérje expresszió mérések Western blottal	12. old.
3.7.1.	Mikro-RNS prekursorok transzfekcióját követő Wee1 fehérje expresszió mérése	13. old.
3.7.2.	Az áramlási citométerrel szortolt sejtek foszfo-CDC-2 és RRM2 tartalma	13. old.
3.8.	Hormonmeghatározások az NCI-H295R sejtek tápfolyadékából	13. old.
3.9.	Sporadikus hipofízis, sporadikus mellékvesekéreg és MEN1-hez társult valamint sporadikus mellékpajzsmirigy daganatokon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok	13. old.
3.9.1.	Hipofízis szövetekben a WEE1 fehérje kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal és Western blottal	13. old.
3.9.2.	A ribonukleotid reduktáz 2-es alegységének (RRM2) kimutatása mellékvesekéreg rákban	13. old.
3.9.3.	A menin expressziójának vizsgálata mellékpajzsmirigy daganatokban	13. old.
3.10.	Bioinformatikai módszerek	14. old.
3.10.1.	A mikro-RNS-ek és a cél (target) mRNS-ek közötti interakció feltérképezése	14. old.
3.10.2.	Hipofízis daganatok funkcionális genomikai analízise	14. old.
3.10.3.	A <i>GRβ</i> fokozott expresszió által befolyásolt gének útvonalelemzése	14. old.
3.10.4.	A sejtciklus dependens expressziót mutató gének útvonal elemzése	14. old.
3.11.	Statisztikai analízis	14. old.
4.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	15. old.
4.1.	Örökletes endokrin tumorszindrómák patomechanizmusai, genotípus-fenotípus összefüggések	15. old.
4.1.1.	A <i>RET</i> protoonkogén mutációk geno-fenotípus összefüggései MEN2 szindrómában	15. old.
4.1.2.	A <i>VHL</i> gén eltérései hazai von Hippel-Lindau szindrómában szenvedő betegekben	15. old.
4.1.3.	A <i>VHL</i> gén Ser80Ile és a Pro25Leu variánsok patogenetikai szerepének tisztázása	15. old.
4.1.4.	A szukcinát dehidrogenáz enzim (<i>SDH</i>) alegységeit kódoló gének (<i>SDHB</i> , <i>SDHC</i> , <i>SDHD</i> , <i>SDHAF2</i> ; <i>SDHx</i> gének), <i>MAX</i> és a <i>TMEM127</i> mutációk prevalenciája hazai betegekben	15. old.
4.1.5.	Az <i>SDHx</i> gének aminosavcserevel járó génvariánsainak fenotípust módosító szerepe MEN2-s betegekben	16. old.
4.1.6.	Együttesen előforduló <i>SDHC</i> és <i>PTEN</i> mutációkkal társult klinikai fenotípus	16. old.

4.1.7.	Csírsejtes <i>SDHx</i> variánsok hatása Cowden és Cowden-szerű szindrómában szenvedő betegekben	16. old.
4.1.8.	A szukcinát szerepe a tumorigenézisben	16. old.
4.1.9.	A MEN1 szindrómáért felelős <i>MEN1</i> mutációk beazonosítása és a genotípus-fenotípus összefüggések hazai betegekben	16. old.
4.1.10.	MEN1 szindrómában előforduló mellékvesedaganatok valamint a menin szerepe a mellékvesekéreg daganatok patogenézisében	17. old.
4.1.11.	Nemzetközi együttműködés során igazolt genotípus-fenotípus összefüggések MEN2 szindrómában és örökletes Phaeo/PGL-ákban	17. old.
4.2.	Sporadikus daganatokban igazolt genetikai, epigenetikai eltérések és az ezekhez társult pathomechanizmus	18. old.
4.2.1.	A <i>C4B</i> gén kópiaszámának hatása valamint a <i>CYP21A2</i> gén gyakori variánsainak hatása az ACTH stimulációt követő kortizol válasza jóindulatú mellékvesekéreg adenómás betegekben	18. old.
4.2.2.	A <i>GR</i> N363S variánsának szerepe jóindulatú mellékvesekéreg adenómák patogenézisében, új PCR módszer a <i>GR</i> gén BclI polimorfizmus kimutatására	18. old.
4.2.3.	Nagy áteresztőképességű módszerek integrálása, funkcionális kapcsolatok modellezése	18. old.
4.2.4.	A GR-t kódoló gén izoformáinak szerepe mellékvesekéreg daganatokban	19. old.
4.2.5.	A mellékvesekéregben működő perifériás óra és a GR izoformák szerepe ennek modulálásában	19. old.
4.2.6.	A GR β izoforma szerepe a géntranszkripcióban	19. old.
4.2.7.	A hipofízis daganatok mikro-RNS expressziós mintázata	19. old.
4.2.8.	TGF β útvonal mikro-RNS-ek általi szabályozása hipofízis daganatokban	19. old.
4.2.9.	Emelkedett expressziót mutató mikro-RNS-ek szerepe a WEE1 kináz szabályozásában	20. old.
4.2.10.	A sejtciklus G2/M átmenetében szerepet játszó mikro-RNS-ek szerepe hipofízis daganatokban	20. old.
4.2.11.	A sejtciklusfüggő ingadozást mutató gén és mikro-RNS expresszió vizsgálata, új áramlási citometriás módszer kidolgozása a sejtek sejtciklus szerinti sejtválogatására	20. old.
4.2.12.	Sejtciklusfüggő módon expresszáldó új biomarker a mellékvesekéreg rák prognózisában	21. old.
4.2.13.	A keringésben jelen lévő mikro-RNS-ek mint biomarkerek a hormonrendszer betegségeiben, a miR-483-5p a mellékvesekéreg rák specifikus markere	21. old.
4.2.14.	Menin expresszió és a <i>MEN1</i> 3'UTR-t potenciálisan célzó mikro-RNS-ek szerepe mellékpajzsmirigy daganatokban	21. old.
5.	A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI	22. old.
6.	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	23. old.
6.1.	Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai közlemények időrendben	23. old.
6.2.	Magyar nyelvű folyóiratcikkek	26. old.
6.3.	Az értekezéshez kapcsolódó szerkesztőségi hozzászólások	27. old.
6.4.	Az értekezéshez kapcsolódó könyvfejezetek	27. old.
6.5.	Az értekezésben nem tárgyalt további nemzetközi és hazai közlemények időrendben	28. old.
7.	Tudományometriai adatok	38. old.
8.	Köszönetnyilvánítás	40. old.

1. BEVEZETÉS

A **hormonrendszer daganatainak jelentős része társul monogénes, autoszomális domináns módon öröklődő génhibákhoz**. A betegségek kialakulásáért felelős mutációt hordozó egyének szoros klinikai nyomonkövetésével és az egyes szindrómák esetében preventív műtétekkel a daganatok kialakulása megelőzhető. A molekuláris genetikai diagnosztikai laboratórium fő feladatát a betegségért felelős elváltozások kimutatása jelenti. Kutatómunkám elején a PhD munkám során elkezdett munkát folytattam, amelynek célja az volt, hogy genetikai vizsgálatokkal beazonosítsam a mutációt hordozó betegeket és a genotípus-fenotípus összefüggések alapján a klinikai ellátásban is hasznosítható új adatokat tárjunk fel. Számos szindróma esetén a betegség-okozó géneltérés pontmutáció, amelyek beazonosítása hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel polimeráz láncreakciót (PCR) követő bidirekcionális Sanger DNS szekvenálással történik. Ugyanakkor azonban, a tumorszupresszor gének eltérései lehetnek ún. heterozigóta deléciók is (pl. a *VHL*, *SDHx* gének esetén), amelyek kimutatásához egyéb speciálisabb, kvantitatív meghatározást is biztosító módszerek szükségesek. Ezek bevezetése, validálása és alkalmazása a molekuláris genetikai diagnosztikába szintén munkám részét képezte. Az örökletes endokrin daganatok egyik legizgalmasabb típusa a phaeochromocytoma és paraganglióma (Phaeo/PGL) daganatok. A daganatok kb. 30%-áért valamilyen örökletes génhiba tehető felelőssé és számos szoros genotípus-fenotípus összefüggések is ismertté váltak. Ezek közül kiemelendő, hogy az *SDHB* génmutációkhoz társuló esetekben rendkívül magas a daganatok malignus elfajulása és a terápiás lehetőségek erősen korlátozottak. A kutatómunkám során a Phaeo/PGL gének mutáció analízise, a betegek folyamatos nyomonkövetése a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika klinikus kollégáinak szoros együttműködésével egy több mint 100 betegből álló adatbázist sikerült kialakítani, ami a genotípus-fenotípus összefüggések elemzésében nyújtott kiváló lehetőséget.

Az örökletes tumorszindrómák közül a Multiplex Endokrin Neoplasia 1-es és 2-es típusai, a von Hippel-Lindau szindróma és az Örökletes Phaeochromocytoma/paragangliómák hátterében álló *MEN1*, *RET* protoonkogén, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2* gének, valamint a 2000-es évek második felében, az új generációs szekvenálással beazonosított gének (*MAX*, *TMEM127*) vizsgálatát végeztük el hazai betegeken, ami hozzájárult a hazai betegeken előforduló mutációs spektrum megismeréséhez, valamint a mutációt hordozó betegeken és családtagjaiban a nemzetközi ajánlásoknak megfelelő egyénre szabott, célzott diagnosztikai és terápiás javaslatok alkalmazásához. A MEN2 és az örökletes Phaeo/PGL szindróma közös eltérése a phaeochromocytoma. Az örökletes endokrin daganatszindrómák jól ismert közös sajátossága az, hogy még ugyanazt a csírasejtes mutációt hordozókban is eltérő a különböző manifesztációk penetranciája. Ez arra utal, hogy egyéb tényezők, akár genetikai, epigenetikai illetve környezeti hatások is szerepet játszanak ennek befolyásolásában. Az *SDHx* gének gyakoribb, de funkcionális hatással bíró eltéréseiről igazolódott, hogy számos kórképben bírnak **genetikai módosító** hatással. Az *SDHx* gének gyakoribb variánsainak előfordulásáról és a MEN2 szindrómában betöltött esetleges szerepükről nem állt rendelkezésre információ.

Az örökletes endokrin daganatos kórképek **ritka betegségek**. Ezért, ahhoz, hogy releváns genotípus-fenotípus összefüggéseket ismerjünk fel szükséges a nagyobb esetszámú vizsgálatok elvégzése. Tudományos munkám egyik fontos része volt, hogy az Amerikai Egyesült Államok és Nyugat-Európa vezető endokrin központjaival kollaborációkat alakítsak ki, amelyek keretén belül lehetőségünk volt nagy esetszámú betegek vizsgálatára. Ezekből számos tanulmányt készítettünk, pontos genotípus-fenotípus összefüggéseket állapítottunk meg, amelyek hozzájárultak az örökletes endokrin daganatos szindrómákkal kapcsolatos szakmai ajánlások felülvizsgálatához és az újonnan felismert gének szerepének tisztázásához. Az örökletes szindrómák prevalenciája ismeretlen volt gyermekkorban és nem álltak rendelkezésre olyan adatok sem, amelyek az örökletes Phaeo/PGL-ákban az első daganat eltávolítása után mikor kell számítani a következő tumor megjelenésére, valamint a különböző génhibáknak mi a hatása a progresszióra és túlélésre. A kezelésben egy óriási kihívás a mellékvese műtét. Az örökletes esetekben mindkét mellékvese érintett lehet. Ugyanakkor ezeknek a daganatoknak a kezelése a daganatok sebészi eltávolítását jelenti. Mellékvesevelő tumorok esetében a műtét a mellékvesék teljes eltávolítását jelenti, ami kétoldali esetekben az élethosszig tartó hormonpótlást vonja maga után. A mellékvesék eltávolítása helyett azonban az újabb sebészi lehetőségek igazolták, hogy a daganatok eltávolítása lehetséges a mellékvesekéreg megtartása mellett is. Az ehhez a műtéti típushoz kapcsolódó hosszútávú adatok hiányoztak, így a kooperáció egyik célja volt összehasonlítani a műtéti technikához kapcsolódó hosszútávú következményeket.

Az örökletes kórképek mellett az endokrin daganatok zöme **sporadikus daganat**, vagyis patogenezisükben nem azonosítható örökletes génhiba. Ugyanakkor pl. a mellékvesekéreg daganatok kialakulásával kapcsolatban felmerült az ún. **genetikai hajlamosító tényezők** szerepe, mint patogenetikai okok. Munkám során a jóindulatú, hormonálisan inaktív és jobbra véletlenszerűen felfedezett mellékvesekéreg daganatok kialakulására, biokémiai és genetikai jellegzetességére fókuszáltam. A munkának a fő indikációját az jelentette, hogy ezek a daganatok gyakoriak, az egyéb célból végzett hasi képalkotó vizsgálatok mintegy 8-20%-ában kerülnek felismerésre és számos diagnosztikai és terápiás nehézséget jelentenek. Genetikai hátterük tisztázatlan, bár már PhD munkám során is felmerült, hogy a kóros glükokortikoid hatás és a kontrollálatlan hormonszekréció szerepet játszhat patogenezisükben. Kutatómunkám egyik fontos célja volt a lokális vagyis a helyi, a szöveti glükokortikoid hatásban prerreceptorális és receptorális szinten zajló glükokortikoid hatás elemzése ezekben a betegeken. Korábbi vizsgálataim során a mellékvesekéreg enzimek bioszintézisében kulcsszerepet játszó 21-hidroxiláz enzimet kódoló gén, *CYP21A2* eltéréseit igazoltam egy és kétoldali mellékvesekéreg adenómás betegeken, ami megerősítette, hogy a kóros szteroid bioszintézisnek is szerepe

lehet ezeknek a daganatoknak a kialakulásában. Későbbi munkám során vizsgálatainkat kiterjesztettük a *CYP21A2* gén tágabb kromoszomális régiójának vizsgálatára is. A *CYP21A2* gén a komplement komponens 4-est kódoló *C4* gén közelében helyezkedik el. A *CYP21A2* génnek ismert egy vele nagyfokú homológiát mutató pszeudogénje a *CYP21A1*. A *C4* génnek is két változata a *C4A* és a *C4B* létezik, amelyek a *CYP21* génnek egymást követve helyezkednek el, egy speciális kromoszóma szerkezetben, az RCCX modulban, ami egy kópiaszám változást mutató régió (copy number variation: CNV) része. A CNV-k vizsgálata komplex, a hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel korlátozottan kivitelezhető. Ezért munkánk során több új metodika kialakítására és alkalmazására került sor, amelyek segítségével a teljes CNV régió és ezen belül a *CYP21A2* gén gyakori variánsainak a szteroid hormon koncentrációkra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A glükokortikoid hatás **receptorális szintjének** vizsgálata során a **glükokortikoid receptort** (GR) kódoló gén genetikai variánsait, valamint fehérje izoformáit is analizáltuk mellékvesekéreg daganatos betegekben. A GR felelős a szteroid hatás közvetítésért. A mellékvesekéreg daganatos betegekben gyakran megfigyelhető eltérések (elhízás, cukorbetegség, magasvérnyomás) hasonlóak azokhoz, amelyek a fokozott glükokortikoid hatás során is kialakulnak Cushing szindrómás betegekben. A daganatok kétoldali megjelenése valamilyen szisztémás eltérésre utalhatnak. Ezek a klinikai megfigyelések vetették fel, hogy a mellékvesekéregben a lokálisan termelődő glükokortikoidok és a hatás közvetítéséért felelős GR-nak szerepe lehet a jóindulatú kéregadenómák patogenezisében. A GR-t kódoló génnek számos olyan variánsa ismert, amelyek eltérő receptor affinitással bírnak. Egyes variánsok az N363S és az ún. BclI a fokozott, míg az ER22/23EK és az ún GR β variáns a csökkent hatással mutatott összefüggést. Ezeknek az SNP-nek mellékvesekéreg daganatokkal való esetleges asszociációról kapcsolatban nem állt rendelkezésre irodalmi adat.

A GR-nak több izoformája ismert, amelyek közül a GR α és a GR β a két leggyakoribb. A fizioiógias hatás közvetítéséért a GR α a felelős. A **GR β izoforma** megjelenését összefüggésbe hozták a glükokortikoidok iránti rezisztencia kialakulásával. Több olyan körképben mutatták ki expressziójának emelkedését, amelyekben a glükokortikoidok iránti rezisztencia is megjelent (pl. szteroid rezisztens asztma, gyulladásos bélbetegség). A GR-hoz kapcsolódó mechanizmusok vizsgálata során elsőként igazoltuk a GR β izoforma expresszióját mellékvesekéregben. Mind a GR α és a GR β is fokozott expressziót mutatott a kortizolt termelő daganatokban a normál mellékvesekéreghez képest. A GR β expressziójának megjelenése kortizolt termelő daganatokban felvetette, hogy a GR-nak szerepe lehet az intraadrenalis glükokortikoid elválasztás szabályozásában is, és a GR β , mint egy domináns negatív izoforma szerepet játszhat az intraadrenalis glükokortikoid rezisztenciában. A GR β -ról bizonyított, hogy gátolja a GR α hatását, de ellentmondásos adatok álltak rendelkezésre arról, hogy a géntranszkripciót hogyan szabályozza. Ennek tisztázására létrehoztunk egy stabil sejtvonalat, ami fokozottan expresszálja a GR β izoformát, és ennek felhasználásával vizsgáltuk a géntranszkripcióra gyakorolt hatását, valamint a bélhámsejtekben kialakuló szteroid rezisztencia mechanizmusát.

Az örökletes genetikai tényezők talaján kialakuló pathomechanizmusok jól ismertek. A *RET* protoonkogén egy tirozin kináz receptort kódol, ami a MEN2 szindrómát okozó mutációk révén konstitutívan aktiválódik. A von Hippel-Lindau szindrómáért felelős *VHL* gén a hipoxia indukálható faktor 1 α (HIF1 α) lebontásában szerepet játszó mechanizmusban vesz részt, ami a gént érintő mutációk révén károsodik, amelynek következtében a HIF1 α stabilizálódik. Az örökletes Phaeo/PGL-mál háttérben álló *SDHx* gének a szukcinát dehidrogenáz enzim károsodása révén mitokondriális diszfunkciót eredményeznek. A felhalmozódó szukcinát gátolja a prolin-hidroxiláz enzimeket (PHD), pl. a 2-es típusú PHD-t, ami a HIF1 α hidroxilálását végzi. *SDHx* mutációk következtében a szukcinát akkumulálódik és a HIF1 α stabilizálódik (pseudo-hypoxia mechanizmus). *SDHx* mutációkhoz társult Phaeo/PGL tumorszövetek génexpressziós mintázata hasonlított a *VHL* mutációkhoz társult Phaeo-kban igazolt mintázatokkal, ami megerősíti ennek a mechanizmusnak a szerepét az *SDH* mutációkhoz társult daganatokban. Ugyanakkor a **hormonális rendszer sporadikus előfordulása daganataiban zajló molekuláris mechanizmusok** kevésbé ismertek.

A **sporadikus előfordulású daganatokban** több tumortípus esetében igazolták a kis RNS-ek, a **mikro-RNS-ek** általi szabályozás szerepét a daganatok patogenezisében. Ezek az adatok a mikro-RNS expresszió vizsgálatokból eredt, amelyekkel megváltozott mikro-RNS expressziót mutattak ki a daganatok és a normális szövetek között. A 20-24 nukleotid hosszúságú kis RNS-ek (mikro-RNS-ek) a génexpressziót posztranszkripciósi módon szabályozzák azáltal, hogy képesek kötődni a fehérjéket kódoló géneket kódoló hírvívő RNS-eihez (mRNS) és a mikro-RNS-mRNS interakció révén gátolják a transzlációt vagy az mRNS-ek lebontását okozzák. A különböző szövetekben és különböző élettani folyamatok során is a mikro-RNS-ek expressziós mintázata dinamikusan változik. A mikro-RNS kutatás nem állhat meg a beazonosított mikro-RNS-ek szintjén, hiszen a kórosan felszaporodott vagy akár a kórosan csökkent expressziót mutató mikro-RNS-ek biológiai hatásainak kimutatásához szükségesek egyéb, pl. génexpressziós, fehérje expressziós vagy *in vitro* funkcionális vizsgálatok is. A releváns biológiai hatás igazolására komplex vizsgálatokra, ún. **nagy áteresztőképességű** módszerekkel kapott eredmények integrálására, bioinformatikai adatfeldolgozásra majd *in vitro* funkcionális vizsgálatok egyidejű elvégzésére van szükség. A mikro-RNS-ekhez kapcsolódó egyik legjelentősebb probléma az adott mikro-RNS-hez tartozó **cél mRNS-ek azonosítása**. A mikro-RNS-ek potenciális célgénjeinek azonosításához (**target predikció**) ún. predikciós algoritmusokat használnak. Általában ezek az algoritmusok többféle adat alapján becsülik meg a potenciális kapcsolatot, de fontos megjegyezni, hogy egy mikro-RNS-hez több ezer célgén is prediktálható.

Kutatómunkánk során a mikro-RNS-ek szerepét **hipofízis adenomákban vizsgáltuk**. A hipofízis daganatok többnyira sporadikus megjelenésűek, mindössze 5%-ban jelentkeznek familiáris formában. Kialakulásukban hipotalamik és hipofízis eredetű okokat feltételeznek. A primer molekuláris biológiai elváltozásra utal az a megfigyelés, hogy a legtöbb sporadikus adenoma monoklonális, de feltételezhető, hogy a primer defektus kialakulása után a daganatos sejtklónok növekedésében szerepet játszanak a hipotalamusz felől érkező stimulusok is. Vizsgálataink egybeestek a molekuláris

biológiai módszerek rohamos fejlődésével. A hagyományos molekuláris biológiai módszerek mellett az utóbbi években előtérbe kerültek az ún. nagy áteresztőképességű technológiák használata. A teljes genom gén és mikro-RNS expresszió, valamint ezen adatok integrálásával és bioinformatikai feldolgozásával olyan biológiai folyamatok kerülhetnek beazonosításra, amelyek a korábbi egy-egy gént, molekulát célzó vizsgálatokkal rejtve maradtak. Hipofízis vonatkozásában a mikro-RNS-ekre vonatkozóan a növekedési hormont és ACTH-t termelő tumorok esetében voltak előzetes eredmények. Ezek igazolták, hogy a hipofízis gazdag mikro-RNS-ekben. Ugyanakkor a leggyakoribb tumor típus esetében (a hormont nem termelő, inaktív hipofízis adenóma, non-functioning pituitary adenoma: NFPA) nem volt ismert a mikro-RNS-ek szerepe.

A hipofízis daganatokban beazonosított mikro-RNS-ek, valamint a kutatócsoport korábbi, mellékvesekéregregrákban igazolt mikro-RNS mintázata a sejtciklus szabályozására utalt. A **sejtciklus** az eukarióta sejtek ismétlődő növekedési és osztódási folyamata, amelynek során örökítőanyaguk megkettőződését követően – optimális esetben – két leánysejtre osztódnak. Ez egy szigorúan szabályozott folyamat, melynek során az egymást követő egyes fázisok felkészítik a sejtet a sikeres megkettőződésre, ami a növekedés, fejlődés és differenciálódás előfeltétele. A sejtciklus optimális működését három ellenőrzőpont biztosítja; a restriktációs ponton átjutva exogén és endogén szignálok eredőjeként köteleződik el a sejt a “minden-vagy-semmi” elve alapján az osztódás irányába. A DNS sikeres és hibátlan megkettőződése az előfeltétele a G2/M ellenőrzőpont sikeres átlépésének. Megváltozott sejtciklus dinamika a daganatos sejtekre jellemző. Általánosságban elmondható, hogy a sejtciklust hajtó ciklinek és ciklin-dependens kinázok (CDK) fokozott, míg a ciklin-depenens kináz inhibitorok (CKI) és egyéb tumorsuppresszor gének csökkent kifejeződése figyelhető meg a daganatokban az ép szövetekhez képest. Tumorsuppresszor mikro-RNS-ek elvesztése és az ún. onkomir-RN-ek felszaporodása a daganatokban a sejtciklus felgyorsulását, a proliferáció fokozását eredményezi. Kutatómunkánk során megfigyeltük, hogy a hormonrendszer daganatai közül a sporadikus hipofízis adenómában és mellékvesekéreg karcinómában is a megváltozott expressziót mutató mikro-RNS-ek olyan géneket céloznak, amelyek a sejtciklus szabályozásában játszanak kritikus szerepet.

A sejtciklus transzkripció programjának vizsgálata bonyolult feladat, hiszen kezeletlen sejtenyészetekben a különböző sejtek aszinkronizáltak, a sejtciklus különböző fázisaiban vannak, így natív sejtenyészetek expressziós vizsgálatával nem tudunk betekintést nyerni a sejtciklusfüggő transzkripció programba. Ezért a **sejtciklusfüggő transzkripció program jellemzéséhez** olyan sejtes csoportok szükségesek, melyek azonos fázisokban vannak. Ennek elérésére különböző kezelések használatosak: szinkronizálás, mitotikus lerázás, centrifugális ülepítés és áramlási citométerrel történő szortálás. Ugyanakkor ezek a kezelések az alap transzkripció programot is befolyásolhatják, így az eredmények csak korlátozottan reprezentálják a natív sejtciklusfüggő expresszióváltozást. Kutatómunkánk során az egyik fontos feladat volt olyan vizsgáló módszer kidolgozása, amivel a sejtciklus fázisai szerint tudunk elegendő számú sejtet nyerni, amelyekből megfelelő mennyiségű RNS-t lehetett izolálni teljes genomos vizsgálatokhoz. A mikro-RNS-ek expresszióinak dinamikus, sejtciklusfüggő módon történő módjáról nem álltak rendelkezésre adatok. A sejtválogatásos módszer felhasználásával nyert sejtekben több nagy áteresztőképességű molekuláris biológiai módszert használva a világon elsőként vizsgáltuk a mikro-RNS expresszió sejtciklus-dependens változásait normális és daganatos sejtekben.

A stabil kifejeződést mutató mikro-RNS-ek alkalmasnak tűnnek biomarkerként történő alkalmazásra. A hormonrendszer daganatai közül a **mellékvesekéregregrák** egy rendkívül rosszindulatú daganat, amelynek felismerése és kezelése is óriási kihívást jelent. A kutatócsoportunk korábbi munkái során több olyan mikro-RNS-t is talált, amelyeknek az expressziója a rákban magasabb volt mint az ép szövetben és expressziójuk mérése felvetette biomarkerként történő alkalmazásukat. Ezek közül a mikro-RNS-ek közül számos a keringésben is jelen van. Ugyanakkor a mellékvesekéregből történő kiürülésükben a hormonhatások szerepet játszhatnak. A mellékvesekéreg daganatok laboratóriumi kivizsgálása során számos stimulációs endokrin vizsgálatra is sor kerül, ami befolyásolhatja a mellékvesekéregből ürülő mikro-RNS-ek mennyiségét is. A keringésben jelen lévő mikro-RNS-ek meghatározása során a preanalitikai és analitikai tényezők egységesítése szükséges. Munkám során a mellékvesekéregregrák esetében felmerült keringő mikro-RNS-ek vizsgálatára fókuszáltam.

Összekapcsolva a genetikai, örökletes mutációkhoz kapcsolódó pathomechanizmust az epigenetikai szabályozással vizsgálatot végeztünk mellékpajzsmirigy adenómákban is. A MEN1 szindróma vezető tünete a mellékpajzsmirigy adenóma. Ugyanakkor szomatikus *MEN1* mutációkat azonosítottak a sporadikus mellékpajzsmirigy daganatok kb. egy harmadában is, ami alátámasztja a *MEN1* kritikus szerepét ezekben a daganatokban. A *MEN1* által kódolt gén a menin tumorsuppresszor fehérjét kódolja, a daganatképződés a Knudson félé két ütés elmélet szerint következik be. MEN1 szindrómában a daganatok kialakulásáért a *MEN1* gén csírasejtes mutációja után a szövetben bekövetkező normális allél elvesztése, mutációja vagy egyéb úton bekövetkező géncsökkentése szükséges a tumor kialakulásához. Ezeknek a folyamatoknak az eredménye a menin fehérje hiánya a *MEN1*-hez társult esetekben. A menin expressziójáról mellékpajzsmirigy daganatokban csekély információ állt rendelkezésre és szintén nem volt ismert a MEN1 szindrómához társuló és a sporadikus mellékpajzsmirigy adenómákban a potenciálisan *MEN1* 3'UTR-t célzó mikro-RNS-ek expressziója.

2. CÉLKITŰZÉSEK

I. Örökletes endokrin tumorszindrómákért felelős genetikai eltérések beazonosítása a hazai beteganyagban:

1. A *RET* protoonkogén mutációk geno-fenotípus összefüggései MEN2 szindrómában
2. A *VHL* gén eltérések vizsgálatával beazonosítani a hazai von Hippel-Lindau szindrómában szenvedő betegeket
3. A *VHL* gén Ser80Ile és a Pro25Leu variánsok patogenetikai szerepének tisztázása
4. A pheochromocytomára és paragangliómára hajlamosító génelváltozások közül a szukcinát dehidrogenáz enzim (SDH) alegységeit kódoló gének (*SDHB*, *SDHC*, *SDHD*: *SDHx* gének) és a *TMEM127* mutációnak hazai feltérképezése
5. Az *SDHx* gének aminosavcserével járó génvariánsok fenotípust módosító szerepének tisztázása MEN2-s betegekben
6. Bemutatni az együttesen előforduló *SDHC* és *PTEN* mutációkkal társult klinikai fenotípust
7. Feltérképezni a csírasejtes *SDHx* variánsok hatását Cowden és Cowden-szerű szindrómában szenvedő betegekben
8. A szukcinát hatásainak összegzése a tumorigenézisben, új jelátviteli mechanizmusok megismerése céljából
9. A MEN1 szindrómáért felelős *MEN1* mutációk beazonosítása és a társult fenotípus tisztázása hazai betegekben
10. MEN1 szindrómában előforduló mellékvesedaganatok és a menin és interakciós partnereinek szerepe a mellékvesekéreg daganatok patogenézisében, a menin dinamikus interakciónak bemutatása a tumorigenézisben
11. Nemzetközi együttműködés keretén belül új genotípus-fenotípus összefüggések feltárása MEN2 és örökletes Phaeo/PGL-ákban

II. A helyi (szöveti) hormonhatásban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének: a 21-hidroxilázt kódoló gén (*CYP21A2*) és a glükokortikoid receptort kódoló gén (*GR*) gyakori variánsait célzó vizsgálatokkal az alábbi specifikus kérdéseket vizsgáltam:

12. A *GR* N363S variánsának szerepe jóindulatú mellékvesekéreg adenómák patogenézisében
13. A *GR* gén BclI polimorfizmus kimutatására kidolgozni egy olcsó és gyors PCR alapú módszert
14. A *C4B* gén kópiaszámának hatása az ACTH stimulációt követő kortizol válasza jóindulatú mellékvesekéreg adenómás betegekben
15. A *CYP21A2* gén gyakori génvariánsok összefüggnek-e a keringésben mérhető mellékvesekéreg hormon koncentrációkkal

III. A hormonrendszer daganataiban zajló molekuláris mechanizmusok vizsgálatában a következő célkitűzéseket fogalmaztam meg:

16. Hogyan lehet integrálni a különböző szintekről (RNS, DNS és fehérje) származó nagy áteresztőképességű módszerrel kapott mérési eredményeket és hogyan lehet ezeket funkcionálisan validálni?
17. A *GR-t* kódoló gén izoformái expresszálódnak-e a mellékvesekéregben és a hormont termelő daganatokban?
18. A mellékvesekéregben működik-e perifériás óra és a *GR* izoformáknak van-e szerepe ennek a szabályozásában?
19. Mi a szerepe a *GRβ* izoformának a géntranszkripcióban?
20. Különbözik-e a mikro-RNS expressziós mintázat hipofízis daganatokban, és milyen jelátviteli utak érintettek általuk?
21. A daganatokban fokozott expressziót mutató mikro-RNS-ek szabályozzák-e a sejtciklus G2/M átmenetben szerepet játszó WEE1 kinázt?
22. Vannak-e egyéb gén-mikro-RNS interakciók, amelyek a G2/M átmenetet szabályozzák hipofízis adenómákban?
23. Milyen mikro-RNS-ek vesznek részt a TGFβ jelátviteli út szabályozásában?
24. Hogyan lehet gyógyszermentesen vizsgálni a sejtciklusfüggő ingadozást mutató gén és mikro-RNS expressziót? Milyen a mikro-RNS expresszió a sejtciklus fázisaiban?
25. Van-e olyan fehérje, amelyek sejtciklus dependens módon expresszálódnak és a mellékvesekéregben prognosztikai vagy terápiás marker lehet?
26. A mellékvesekéregben a keringésből mérhető mikro-RNS-ek koncentrációját befolyásolják-e a betegek kivizsgálása során használt dinamikus endokrin tesztek?
27. Milyen a menin expresszió MEN1-hez társult és sporadikus mellékpajzsmirigy adenómákban? Milyen szerepe van szindrómás és sporadikus mellékpajzsmirigy adenómákban a *MEN1* 3' UTR-t célzó mikroRNS-eknek?

3. **BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

3.1. **Betegek és egészséges egyének**

3.1.1. **Örökletes endokrin tumorszindrómákban szenvedő betegek**

Az örökletes endokrin tumorszindrómákban szenvedő betegek genetikai kivizsgálása a **Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Genetika Laboratóriumában** történik. PhD munkám során került sor a laboratórium kialakításra, ami azóta is folyamatosan működik. A betegek genetikai tanácsadást követően Beleegyező Nyilatkozatot írnak alá, majd perifériás vérmintavételezés történik. Valamennyi humán mintán végzett vizsgálathoz érvényes engedéllyel rendelkezünk az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásügyi Bizottságától és minden résztvevő beteg és hozzátartozó esetében a genetikai vizsgálat végzéséhez beleegyező nyilatkozat aláírása után került sor mintavételezésre.

A Multiplex Endokrin Neoplázia 2-es típusal diagnosztizált betegek közül az első vizsgálatban 18 családból 40 örökletes medulláris pajzsmirigyrákos (MTC) beteg elemzésére került sor. A második vizsgálatban, amelynek során az *SDHx* génpolimorfizmusok fenotípus módosító hatását elemeztük összesen 77 csírasejtes *RET* mutációt hordozó MEN2 szindrómában (55 MEN2A), 48 sporadikus MTC, 48 sporadikus Phaeochromocytómás (Phaeo) beteg vizsgálatára került sor. A sporadikus MTC és sporadikus Phaeo/PGL betegek esetében a *RET* és a Phaeo/PGL gének vizsgálata negatív eredményt mutatott.

A hazai VHL betegségben szenvedők feltérképezése során összesen hét család 35 tagja valamint a Ser80Ile mutáció elemzése során 1 család 32 tagjának vizsgálatára került sor. Az *SDHx*, *TMEM127*, *MAX* gének vizsgálata 82 látszólag sporadikus Phaeo/PGL-s betegekben történt meg.

Az Amerikai Egyesült Államokban végzett kutatómunkám során összesen 375 *PTEN* mutáció negatív Cowden szindróma (CS) vagy Cowden-szindrómára emlékeztető (CS-szerű) beteg genetikai vizsgálatában vettem részt. Itt ismertük fel a mindezidáig egyetlen olyan beteget, aki *PTEN* és *SDHC* mutációt is hordozott.

A SE II. Belgyógyászati Klinikán MEN1 szindróma miatt kezelt és vizsgált 19 család 32 betegében végeztük el a *MEN1* gén vizsgálatát.

3.1.2. **Sporadikus, jóindulatú mellékvesekéreg adenómával diagnosztizált betegek**

A SE II. Belgyógyászati Klinikán gondozott jóindulatú mellékvesekéreg adenómás betegek közül munkám során 99 egyoldali, 44 kétoldali mellékvese adenómás, 100 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő beteget és 102 populációs kontroll egyént elemeztünk a GR génvariánsok vizsgálatához. Az összes betegnél részletes klinikai és hormonális kivizsgálás történt, amely valódi és szubklinikai Cushing szindrómát, phaeochromocytómát, primér aldosteronizmust és hyperandrogenizmust kizárt. Az egyoldali mellékvese daganatos betegek közül 32 betegben történt féloldali adrenalectomia a tumor 4 cm-nél nagyobb mérete, vagy a követés során észlelt daganat-növekedése miatt. 27 betegben állt rendelkezésre a szövettani diagnózis eredménye, amely 23 betegben mellékvesekéreg adenómát, 2 betegben microadenomatosus hyperplasiát, egy betegben atípusos kéregadenómát, egy betegben pedig mellékvesekéreg adenómát mutatott csont metaplasziával. A 102 kontroll személyben és a 100 2-típusú diabetes mellitusban szenvedő betegben a HPA tengely működés zavarának semmilyen klinikai jelét nem észleltük.

A mellékvesekéreg adenómás betegek közül 77 esetben voltak meg az alap és ACTH-stimulált kortizol értékek így a C4B gén kópiaszámának valamint a CYP21A2 gén gyakori variánsainak hatását ezekben a betegekben tudtuk vizsgálni.

3.1.3. **Hormonvizsgálatok**

Vizsgálataink során valamennyi mellékvesedaganattal vagy hipofízis daganattal diagnosztizált és kezelt beteg részletes hormonális kivizsgáláson esett át. A szérumszteroid hormonok mérésében a 2002-es NIH konszenzus ajánlás volt. Mértük a reggeli (8 és 9 óra között), éjfélkor illetve alacsony dózisú dexamethason szuppressziós tesztet követő szérumszteroid szinteket, az ACTH alap és metyrapon kezelést követően, a kortikoszteron, dehidrokortikoszteron és dehidroepiandrosteron-szulfát koncentrációkat, valamint a 17-hidroxiprogesteron koncentrációkat alap és CTH-stimuláció után. A kortikoszteroid koncentrációkat a Semmelweis Egyetem ÁOK II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrin Laboratóriumában kifejlesztett nagy specificitású radioimmúnassay módszerekkel határoztuk meg (136-138 Vécsei) vagy elektrokemilumineszcens immunoassay-vel végeztük (Elecsys, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) a gyártó előírásainak megfelelően. Vizelet és plazma metanephrin szint meghatározása mellett a hypertóniás betegeknél szérumszódium, kálium és aldosteron/renin mérés is történt.

3.2. **Daganatszövetek**

3.2.1. **Hipofízis daganatok**

Összesen 137 (107 NFA, 15 GH-termelő adenoma PRL termeléssel vagy a nélkül /GH±PA/ és 15 ép szövet /NH/) hipofízis szövetminta került feldolgozásra. Az adenoma szöveteket transzphenoidális műtéttel távolították el az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetben. A betegek a vizsgálatról teljes körű információt kaptak és ezt követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A daganatok osztályozása a betegek klinikai paraméterei, hormonleletei és az eltávolított adenomák patológiai vizsgálata alapján történt. A rutin szövettani vizsgálat, a hipofízis mellső lebeny hormonok immunhisztokémiai vizsgálata és a MIB1

proliferációs marker meghatározása a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt.

3.2.2. Mellékvesekéreggrák szövetmintái

A ribonukleotid reduktáz 2-s alegységének (RRM2) a mellékvesekéreg karcinómák proliferációs aktivitásának függvényében való kifejeződését 12 humán mellékvesekéreg-karcinóma szövetmintán vizsgáltuk. A vizsgálatra kiválasztott, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében őrzött, formalinban fixált, paraffinba ágyazott daganatok korábbi, rutin szövettani diagnózisa megerősítette a mellékvesekéreg-karcinóma diagnózist.

3.2.3. Mellékpajzsmirigy daganatok

A menin expressziót és a *MEN1* 3' UTR-t célzó mikroRNS-ek kifejeződését összesen 56 mellékpajzsmirigy szövetben határoztuk meg. Az 56 szövetminta közül 40 sporadikus mellékpajzsmirigy adenóma és 16 MEN1 szindrómában szenvedő betegből eltávolított daganatszövet volt. A műtétek a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján történtek. A szövetek hisztopathológiai feldolgozását a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézetében végezték.

3.3. Molekuláris genetikai módszerek

3.3.1. Örökletes genetikai eltérések vizsgálatához alkalmazott módszerek

Az örökletes tumorszindrómákban valamint a genetikai asszociációs vizsgálatokhoz genomális DNS-t izoláltunk kereskedelmi forgalomban kapható kitékkel (Roche DNA Isolation for Mammalian Blood, és Qiagen DNA Isolation kit). A mutációk analízise specifikus primerekkel végzett PCR során amplifikált DNS-szakaszok direkt szekvenálásával történt. A dolgozatban minden gén vizsgálatához alkalmazott primereket táblázatos formában bemutatásra kerültek.

Az ún. nagy deléciók kimutatására multiplex ligációs próba amplifikációt (MLPA) is beállítottunk. A módszer elve az, hogy a célgén DNS-éhez komplementer DNS-próba fog kapcsolódni. A hibridizáláshoz a próbát kettéhasított állapotban adjuk a denaturált, szolubilis DNS-hez, majd ligáz segítségével az illeszkedő végeket összekapcsolják. A ligáz csak kettős szálú DNS esetén, a próba és a denaturált DNS pontos összekapcsolódásakor működik. Munkám során a *VHL*, *SDHx* gének hemizigóta eltéréseinek kimutatásában alkalmaztam ezt a módszert.

A *sporadikus előfordulású mellékpajzsmirigy daganatokban a MEN1* gén szomatikus mutációinak a vizsgálatához 4 darab 20 µm vastagságú formalin-fixált paraffinba ágyazott metszetből, ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega) kittel izoláltuk a DNS-t. A DNS fragmentáltsága miatt, a csírasejtes mutáció vizsgálatához használt primerek helyett új, általunk tervezett primereket használtunk. A PCR reakciót követő PCR termék tisztítása és a Sanger-féle szekvenálás megegyezett a csírasejtes mutáció vizsgálatokhoz használt módszerekkel.

3.3.2. A *C4B* és a *CYP21A2* gének kópiaszám és a *CYP21A2* gén szekvenálása

A *C4* és *CYP21A2* gének kópiaszám meghatározását kvantitatív valós idejű PCR-el végeztük el. A *C4A* és *C4B* gének kópiaszáma külön reakcióelegyben került meghatározásra. A reakcióelegyben a szensz primer (Forward: 5' GCAGGAGACATCTAACTGGCTTCT 3') és a reverz (5' CCGCACCTGCATGCTCCT 3') primerek mellett TaqMan Universal PCR Master Mix és 50 ng genomális DNS volt. A *C4A* specifikus TaqMan próba VIC jelölésű (5' VIC-ACCCCTGTCCAGTGTTAG-MGB 3'; MGB: minor groove binding non-fluorescent quencher), míg a háztartási gén FAM-jelölésű volt. A referencia gén az RNase P Detection Mix (ABI Cat.No. 4316831) volt. A másik csőben a *C4B* specifikus Taq-Man próba volt FAM jelölésű (5' FAM-ACCTCTCTCCAGTGATAC-MGB3') és az RNase P volt VIC-el jelölve (RNase P Detection Mix; ABI Cat. No. 4316844). A reakció végtérfogat 25 µl volt.

A *CYP21A2* gén vizsgálatához több új módszert fejlesztettünk. Ezek közül a legfontosabb az ún. long range PCR alapú haplotipizálás, amihez a teljes RCCX modul amplifikációját el kellett végezni. A *CYP21A2* gén kópiaszám meghatározáshoz a *CYP21A2-F*: GACCTGTCCTTGGGAGACTACT és a *CYP21A2-R*: CCTCAGCTGCATCTCCACGA oligonukleotid primereket használtuk. A *CYP21A2* génre specifikus szekvenálásokhoz a templátot *CYP21A2-re* specifikus nested PCR-el hoztuk létre. A *CYP21A2* gén 2. intronjának szekvenálásával a teljes *CYP21A2* gén karakterizálható volt. Az ehhez használt primerek szekvenciája a következő volt: SEQ_12F: GGCAGACTTTGCTGGCAGACCT és SEQ_16R: AGAACTCCTGGGTCAGCTGCTC. PhD munkám elején a *CYP21A2* gén klinikai szempontból legjelentősebb mutációit (8 bp. deléció, I172N, exon 6 cluster, p.V281L, p.L307insT, p.Q318* és p.R356W) allél-specifikus PCR-el határoztam meg. Minden Sanger szekvenálást BigDye Terminator Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) reagenssel készítettük. A szekvenálási reakciók kapilláris elektroforézisét ABI 310 vagy ABI31000 típusú szekvenátorokon futtatuk (Applied Biosystems). A *CYP21A2* intron 2 haplotípusok felállításához a PHASE software v2.1.1-et alkalmaztuk. Hardy-Weinberg equilibrium tesztelését Arlequin v3.5 szoftverrel, a kapcsolsági vizsgálatokat DnaSP v5.10.01 szoftverrel, vizualizációját Haploview v4.2

programcsomaggal végeztük el. A teljes vizsgálati protokollt és az összes primer szekvenciáját a dolgozat tartalmazza.

3.3.3. A glükokortikoid receptor (GR) génvariánsok vizsgálata

A GR gén N363S polimorfizmus vizsgálatára új módszert dolgoztunk ki, ami a korábban alkalmazott restriktációs fragment hosszpolimorfizmus (RFLP) módszert váltotta ki, egy enzimemésztést és egy agaróz elektroforézis költségét takarítva meg. A módszer során új allélspecifikus reverz primereket terveztünk, amelyek a 3'-végeken található nukleotidban térnek el egymástól: 336W: 5'-ATCCTTGGCACCTATTCCAAT-3'; 363M-5'-ATCCTTGGCACCTATTCCAAC-3'. A PCR elegyben a forward primer (2/4F: 5'-CCAGTAATGTAACACTGCCCC-3') 0,5 µmol/l koncentrációban volt jelen, a nem specifikus reverz primer (2/4R: 5'-TTCGACCAGGGAAGTTCAGA-3'), illetve az egyik allélspecifikus reverz primer (363W vagy 363M) pedig 0,25 µmol/l koncentrációban. Az új reakcióval nyert PCR termék minden esetben tartalmazott egy 357 bázispár méretű fragmenst, amely belső kontrollként szolgált, valamint a specifikus primer által felismert szekvencia jelenléte esetén (363W – aszparagin, 363M – szerin) egy allélspecifikus 306 bázispár méretű fragmenst.

3.3.4. A GR génexpressziós vizsgálata

GRα és GRβ mRNS-ek mennyiségét kvantitatív valósídejű PCR-rel határoztuk meg. A GRα és GRβ izoformák különálló detektálására primereket és próbákat terveztünk; GRα (Genebank azonosítószám: X03225) és GRβ (Genebank azonosítószám: X03348). A GRα amplifikálása a következő primerekkel történt: GRαF, 5'-AACTGGCAGCGGTTTTATCAA- 3' és GRαR, 5'- TGGAAGCAATAGTTAAGG-AGATTTTCA-3'. A TaqMan próba szekvenciája: FAM-CCACTTCATGCATAGAATCCAAGAGTTTTGTCA-TAMRA. A GRβ amplifikálása a következő primerekkel történt: GRβF, 5'-AACTGGCAGCGGTTTTATCAA-3' és GRβR, 5'-TGTGAGATGTGCTTTCTGGTTTTAA-3', a TaqMan próba szekvenciája: FAM-CATAACATTTTCATGCATAGAAT-CCAAGAGTTTTGTCA-TAMRA. A primer párok jelölése FAM és TAMRA festékekkel történt (Genosys, Sigma).

3.3.5. A circadián génexpresszió vizsgálata H295R mellékvesekéreg sejt vonalban

H295R sejteket Dulbecco's modified Eagle's médium és Ham's F12 Nutrient Mixture 1:1 arányú keverékében tartottuk fent, melyet 15mM HEPES-sel, 6,25µg/ml inzulinnal, 6,25µg/ml transferrinnel, 6,25ng/ml szeleniummal, 1,25mg/ml borjú szérum albuminnal (BSA), 5,35µg/ml linolénsavval és 2,5% Nu-szérummal egészítettük ki. Szérum sokk kísérletekben a sejteket 24 órás szérum éheztetést követően 30% Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékban inkubáltuk 2 órán keresztül, majd aktív szénen átszűrt Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékba helyeztük át. A GRα kísérletekben a sejteket 24 órás szérum éheztetést követően aktív szénen átszűrt tápfolyadékba kerültek és vívőanyaggal (0,01% etanol), 100nmol DEX-zal, 1µmol RU486-tal vagy 100nmol DEX és 1µmol RU486 kombinációjával kezeltük. A metyraponnal (100µmol) vagy metyrapon (100µmol) és RU486 (1µmol) kombinációjával történő kezelés során a sejtek előkezelése a fentebb részletezett módon történt. A kezeléseket után 36 órával bezárólag 16 időpontban kerültek a sejtek begyűjtésre, így a napszaki ingadozáshoz szükséges időintervallumok biztosításra kerültek.. Minden kísérletet három független biológiai mintán végeztük el.

3.3.6. Glükokortikoid receptor béta izoformát (GRβ) expresszáló sejt vonal létrehozása

Caco-2 és Caco-2GRβ sejteket Minimum Essential Médiumban tartottam fenn, melyet 10% főtális borjú szérummal (FBS), 1mM nátrium-piruváttal, 0,1mM nem-esszenciális aminosavakkal és 1% penicillin/sztreptomycinnel egészítettem ki. A GRβ klónozása a GRα izoformából történt, a közös α-β régiót célzó szenz oligonukleotid primer és a GRβ szekvenciájára specifikus antiszenz primer segítségével. A PCR fragmentumokat pcDNA3.1 vektorokba klónoztuk. A plazmidok bázissorrendjét direkt DNS szekvenálással ellenőriztük. A Caco-2 sejteket FuGene Transzfekciós Reagens használatával GRβ-t tartalmazó plazmiddal vagy üres pcDNA3.1 plazmiddal transzfektáltam a gyártó használati utasításainak megfelelően. A klonális szelekció neomycin kezeléssel történt.

3.3.7. A sejt ciklus dependens gén és mikro-RNS expresszió vizsgálatban használt sejtenyészetek

Ebben a vizsgálatban munkánkat humán primer sejtenyészeten (bőrfibroblaszt – human dermal fibroblast from adult – HDFa, Gibco, Life Technologies) és sejt vonalakon (hormontermelő mellékvesekéreg-karcinoma sejt vonal – NCI-H295R és méhnyakrák sejt vonal – HeLa, American Type Culture Collection – ATCC) végeztük a forgalmazó protokolljainak megfelelően. A különböző kezeléseket, áramlási citométeres mérések az adott kísérlet során részletes bemutatásra kerültek.

3.3.8. Nagyátersztőképességű mRNS és mikro-RNS expressziós mérések

A GRβ géntranszkripcióban valamint a glükokortikoid érzékenységben betöltött szerepének vizsgálata során Caco-2 és Caco-2GRβ sejteket 100 nmol DEX-al vagy vívőanyaggal 8 órát kezeltük. A mintákból RNS izolálást követően a teljes genom mRNS expresszió mérése Agilent44K cDNS microarray-en történt. A

méréseket és az eredmények értékelését Agilent DNA Microarray Scanner and Feature Extraction 9.5.3. programmal végeztük. A microarray adatok további feldolgozása Genespring GX 12.5 program segítségével gyári beállítások mellett történt.

A *sejtciklus során bekövetkező génexpressziós microarray* vizsgálatokhoz 100 ng szortolt G1, S és G2 fázisú HDFa, NCI-H295R és HeLa sejtekből származó RNS-t használtunk. Összesen 24 mintát vizsgáltunk (2 vagy 3 biológiai párhuzamos sejtenként és fázisonként) Agilent whole human genome 4x44K microarray lemezek (Agilent Technologies) a gyártó protokolljainak megfelelően. Az adatok kiértékelése és statisztikai analízise GeneSpring 12.6 szoftverrel (Agilent Technologies) történt. A mikro-RNS expressziós vizsgálatokhoz három nagy áteresztőképességű módszert alkalmaztunk. Összesen 16 minta G1, S és G2 fázisú HDFa és H295R sejtől származó minta mikro-RNS microarray vizsgálata történt meg Agilent 5x15K Human miRNA Microarray lemezek. Összesen 8 darab szortolt G1 (2 minta), S (3 minta) és G2 (3 minta) fázisú NCI-H295R sejtekből izolált RNS mintát kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) alapú TaqMan Low Density Array kártyával (TLDA, Applied Biosystems, Life Technologies) is vizsgáltuk, a gyártó előírásainak megfelelően. Az adatok megerősítéséhez **újgenerációs szekvenálást** is használtunk. A kis RNS szekvenálás Illumina Small RNA Sequencing platformon történt Hong Kongban (BGI Tech Solutions, Tai Po, Hong Kong). A könyvtárkészítés TruSeq Small RNA library preparation kittel történt (Illumina, San Diego, CA, USA). 50 bázispár single end read szekvenálást végeztünk Illumina HiSeq2000 platformon, majd 10 Mb tiszta read analízise történt meg (BGI Tech Solutions, Tai Po, Hong Kong).

A génexpressziós microarray eredményeinek validálásához mintánként 30 ng RNS-t írtunk át cDNS-re SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Applied Biosystems, Life Technologies) segítségével, a gyártó előírásainak megfelelően. A kiválasztott gének expressziójának méréséhez TaqMan Gene Expression Assay-eket használtunk (Applied Biosystems, Life Technologies).

A *hipofízis daganatok mikro-RNS expressziós* mintázatát TaqMan Low Density Array (TLDA) Human MicroRNA Panel v.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével, a gyártó előírásai szerint vizsgáltuk. Az endogén kontroll kiválasztás Normfinder szoftverrel történt, a próba expressziójának stabilitási értékét a csoporton belüli és a csoportok (NFA és NH) közötti variancia alapján számoltam. A legmegfelelőbb endogén kontroll kombinációt 3 háztartási mikro-RNS (MammU6, RNU44 and RNU48) értékének számtani közepe adta. Az expresszió mértékét minden esetben ddCT módszerrel határoztuk meg.

3.3.9. Egyedi génexpressziós mérések validálása kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)

A *GR β géntranszkripció* valamint a glükokortikoid érzékenység vizsgálata során a microarray eredmények validálása során első lépésben reverz transzkripciót végeztünk 1 μ g RNS-ből Superscript III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) használatával. A kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) méréseket előre megtervezett TaqMan Gén Expressziós Array kártya (a felhasznált primerek listája a dolgozatban található) felhasználásával ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) készüléken történt. Az eredményeket a belső kontrollként használt öt háztartási gén (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*GAPDH*), 18S riboszomális RNS (*18S*), Béta-Aktin (*ACTB*), hipoxantin-foszforiboziltranszferáz 1 (*HPRT1*), transzferrin receptor (*TFRC*)) mértani átlagához normalizáltuk. Néhány esetben a sejtdhúzó-, sejtmigráció- és sejtproliferáció-asszociált gének validálása egyedi TaqMan próbák (Life Technologies); ((osteopontin (*SPP1*) [Hs00959010_m1], chitinase-3-like-1 (*CHI3L1*) [Hs01072228_m1] és vimentin (*VIM*) [Hs00958111_m1]) segítségével, 7500 Fast Real Time PCR készüléken (Applied Biosystems) történt. Ezen esetekben a génexpressziót a belső kontrollként használt Béta-Aktin-hoz (*ACTB*) normalizáltuk.

A *circadian ritmust követő génexpressziós mérésekhez* is teljes RNS-t használtunk, amit miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk. A reverz transzkripciót 1 μ g RNS-ből végeztük Superscript VILO Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies), vagy Superscript III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies) használatával. A qRT-PCR-t TaqMan Gén Expressziós Assay-ek (Life Technologies) segítségével végeztük: Period 1 (*PER1*) [Hs01092603_m1]; Period 2 (*PER2*) [Hs00256143_m1]; Cryptochrome 1 (*CRY1*) [Hs00172734_m1]; Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (*ARNTL*) [Hs00154147_m1]; *REV-ERBa* [Hs00253876_m1]; nukleáris receptor 3 C1 (*NR3C1;GR*) [Hs00353740_m1]; Proopiomelanokortin (*POMC*) [Hs00174947_m1]; kortikotropin felszabadító hormon (*CRH*) [s01921237_s1]; és Béta-Aktin (*ACTB*) [Hs99999903_m1]. A valós idejű PCR mérések 7500 Fast Real-Time PCR rendszeren (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) történtek, a gyártó utasításainak megfelelően. A génexpressziót a háztartási génként használt Béta-Aktinhoz (*ACTB*) normalizáltuk.

A *sejtciklusfüggő génexpresszió* nagy áteresztőképességű módszerrel kapott eredmények validálásához mintánként 30 ng RNS-t írtunk át cDNS-re SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Applied Biosystems, Life Technologies) segítségével, a gyártó előírásainak megfelelően. A kiválasztott gének expressziójának méréséhez TaqMan Gén Expressziós Assay-eket (katalógusszám: 4331182; *ARHGAP11A* probe ID: Hs00207575_m1; *ASPM* probe ID: Hs00411505_m1; *KIF14* probe ID: Hs00208408_m1; *GTSE1* probe ID: Hs00212681_m1; *CDCA2* probe ID: Hs00299250_m1; *SKA1* probe ID: Hs00179514_m1; *CCNA2* probe ID: Hs00996788_m1; *AURKA* probe ID: Hs01582072_m1; *AURKB* probe ID: Hs00945858_g1; *CDK1*

probe ID: Hs00938777_m1; *RRM2* probe ID: Hs00357247_g1; *ACTB* probe ID: Hs99999903_m1) használtunk (Applied Biosystems, Life Technologies). A génexpressziót a háztartási génként használt Béta-Aktinhez (*ACTB*) normalizáltuk.

A fold change (FC) számolása a $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ módszerrel történt. Minden mérést három párhuzamos mintán végeztünk el

3.3.10. Egyedi mikro-RNS expresszió mérés kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)

A hipofízis és a szortolt sejtekből származó minták egyedi mikroRNS-expressziójának méréséhez a TaqMan MicroRNA Assay Kit-ekben található stem-loop RT primereket és TM primereket használtunk. A mikro-RNS expressziós mérések validálásához 5 ng RNS-ét átviteltük cDNS-re TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems by Life Technologies) segítségével a gyártó protokolljainak megfelelően. A mikro-RNS expressziót TaqMan MicroRNA Expression Assay-ekkel, 7500 Fast Real-time PCR műszeren végeztük. A, a mikro-RNS expressziót az RNU48 relatív expressziójára normalizáltuk (ΔCt). Az expressziós eredményeket a fold change formulával kvantifikáltuk.

A hipofízis minták egyedi mikro-RNS-expressziójának méréséhez a TaqMan MicroRNA Assay Kit-ekben található stem-loop RT primereket és TM primereket használtunk: hsa-miR-135a (Assay ID: 000460), hsa-miR-135b (Assay ID: 4395372), hsa-miR-543 (Assay ID: 4395487), hsa-miR-422a (Assay ID: 4395408), hsa-miR-383 (Assay ID: 4373018), hsa-miR-378 (Assay ID: 4395354), hsa-miR-516a-3p (Assay ID: 4373183), hsa-miR-155 (Assay ID: 000479), hsa-miR-17-5p (Assay ID: 000393), hsa-miR-93 (Assay ID: 000432), hsa-miR-98 (Assay ID: 000577), hsa-miR-140-5p (Assay ID: 001187), hsa-miR-582-3p (Assay ID: 002399), hsa-miR-582-5p (Assay ID: 001983), hsa-miR-938 (Assay ID: 002181), RNU44 (PN: 4427975, Assay ID: 001094), RNU48 (PN: 4427975, Assay ID: 001006), U6 snRNA (MammU6, PN: 4427975, Assay ID: 001973). A reverz transzkripciót TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit segítségével végeztük (PN: 4366596). Az RT mix 0,15 μl dNTP-t (100 mM), 1 μl MultiScribe reverse transcriptase-t (50U/l), 1,5 μl 10x RT Buffer-t, 0,19 μl RNase inhibitor-t (20 U/ μl), 4,16 μl RNáz-mentes vizet, 3 μl miRNA specifikus stem-loop RT primert és 5 μl (10 ng) teljes RNS-t tartalmazott. Az RT-PCR reakcióelegye 1 μl RT terméket, 0,75 μl TM primer-t, 7,5 μl 2x TaqMan Universal PCR Master Mix-et, 5,75 μl RNáz-mentes vizet tartalmazott (15 μl végtérfigat). A reakció 384-well-es plate-en zajlott 7900 HT RealTime PCR rendszerben.

A sejtciklusfüggő mikro-RNS expressziós nagy áteresztőképességű módszerekkel kapott eredmények validálásához 5 ng RNS-ét átviteltük cDNS-re TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems by Life Technologies) segítségével a gyártó protokolljainak megfelelően. A mikro-RNS expressziót TaqMan MicroRNA Expression Assay-ekkel (katalógusszám: 4427975; hsa-miR-10b probe ID: 002218; hsa-miR-128a probe ID: 002216; hsa-let-7g probe ID: 002282; hsa-let-7a probe ID: 000377; hsa-let-7e probe ID: 002406; hsa-let-7f probe ID: 000382; hsa-let-7i probe ID: 002221; hsa-miR-21 probe ID: 000397; hsa-miR-22 probe ID: 000398; hsa-miR-222 probe ID: 002276; hsa-miR-16 probe ID: 000391; hsa-miR-15a probe ID: 000389; hsa-miR-503 probe ID: 001048; hsa-miR-202 probe ID: 002363; hsa-miR-132 probe ID: 000457; hsa-miR-577 probe ID: 002675; hsa-miR-24-2* probe ID: 002441 és RNU48 probe ID: 001006) mértük (Applied Biosystems, Life Technologies). Háztartási mikro-RNS-ként az RNU48-t használtuk.

A mellékpajzsmirigy daganatokban a *MEN1* 3'UTR-t célzó mikro-RNS-ek vizsgálatához az RNS izolálásához minden mintánál 4 darab 20 μm vastagságú formalin-fixált paraffinba ágyazott metszetből, RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE tissues (Life Technologies by Thermo Fischer Scientific) elnevezésű kittel végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált RNS-t -80°C -on tároltuk. A mintákban található totál RNS koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) mértük. A reverz transzkripcióhoz 5 ng RNS-t használtunk templátként, az átírást TaqMan microRNA reverse transcription kittel (Applied Biosystems by Life Technologies) végeztük. A mintákat a további feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A kiválasztott mikro-RNS-ek szintjét kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval mértük (7500 Fast Real-time PCR készülék, Applied Biosystems by Life Technologies), mikroRNS-specifikus TaqMan próbákkal (próbák azonosítói: hsa-miR-24: 000402, hsa-miR-28: 000411, hsa-miR-326: 000542, hsa-miR-484: 001821, hsa-miR-637: 001581, hsa-miR-744: 002324, RNU6B: 001093, a gyártó az Applied Biosystems by Life Technologies). A vizsgálat során a referencia gén az RNU6B volt. A méréseket 2 technikai párhuzamossal végeztük el. A MEN-1 asszociált és a sporadikus csoportok mikroRNS expresszióját a $\Delta\text{Ct}(\text{sporadikus}) - \Delta\text{Ct}(\text{MEN-1 asszociált})(\Delta\Delta\text{Ct})$ egyenletet alkalmazva hasonlítottuk össze. A fold change értékét az $\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ egyenlet alapján számítottuk ki.

3.4. Áramlási citométerrel végzett mérések

3.4.1. Apoptózis, sejtciklus-disztribúciós és sejtproliferációs vizsgálatok

A daganatellenes szerek hormontermelő NCI-H295R sejtek apoptózisára és sejtciklusuk fázisaira gyakorolt hatását áramlási citometriával vizsgáltuk propidium-jodidos festést követően. A mintákat FACSCalibur áramlási citométeren (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) mértük, egy méréshez legalább 10000 eseményt detektáltunk. Az eredményeket Cell Quest Pro és Winlist szoftverek segítségével értékeltük ki. Az egyes antineoplasztikus szerek proliferációra gyakorolt hatását alamarBlue sejtproliferációs reagenssel (DAL1025, Thermo Fischer Scientific), 96-lyukú tenyésztőedényben vizsgáltuk. Kezelésenként és időpontonként nyolc

párhuzamos mérést végeztünk. Az NCI-H295R hormontermelő mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalon a gemcitabin (G, G6423, Sigma-Aldrich Chemical Co.), a mitotán (M, N12706, Sigma-Aldrich Chemical Co.) és a 9-cisz-retinsav (R, sc-205589A, Santa Cruz Biotechnology) önálló és kombinált adásának hatásait vizsgáltuk. A kezeléseket 24, 48 és 72 óráig alkalmaztuk. Kezelésként és időpontként három (áramlási citometriás, génexpressziós és hormontermelési mérések) ill. nyolc (proliferációs assay) párhuzamos mérést végeztünk.

3.4.2. Sejtciklus szerinti sejtválogatás fluoreszcencia alapján áramlási citométerrel

A HDFa, NCI-H295R és HeLa sejteket 150 cm²-s flasksban tenyésztettük 90%-s konfluenciáig. A sejteket Vybrant DyeCycle Orange (Molecular Probes, Life Technologies) DNS-festékekkel jelöltük. Ez a festék sztöchiometrikan képes jelölni a DNS-t a sejtek viabilitásának megváltoztatása nélkül. Az inkubációt sötétben, 37°C hőmérsékleten, párasított, 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban 30 percig végeztük. Ezt követően 10 perc 1000 rpm fordulatszámon történő centrifugálás után a sejteket Ca²⁺ and Mg²⁺ nélküli, 2% magzati borjúsérumot tartalmazó Hank's Balanced Salt oldatban szuszpendáltuk (szort puffer), majd a szuszpenziót FACSria III sejt szorterrel (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) analizáltuk és szortoltuk. A szortolást megelőző analízishez 100000 eseményt detektáltunk, majd a G1 (egyszeres DNS tartalom), S (egyszeres és kétszeres DNS tartalom közötti intenzitás) és G2 fázisoknak (kétszeres DNS tartalom) megfelelő sejtpopulációkat különválogattuk. A szortolás maximum 30 percig tartott és minden szortolt populációt reanalizáltunk újabb áramlási citométeres analízissel. Az adatokat BD FACSDiva v6.1.3 szoftverrel analizáltuk (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A szortolást követő reanalízis után a sejteket centrifugáltuk (10 perc, 1000 rpm) jéghideg PBS hozzáadásával mostuk, majd újra centrifugáltuk (10 perc, 1000 rpm), majd QIAzol lízis reagensben vagy Western blot lízis pufferben resuszpendáltuk és -80°C hőmérsékleten tároltuk az RNS és fehérje izolálásig.

3.5. Glükokortikoid receptor béta izoformát (GRβ) expresszáló sejtek szteroid érzékenysége vizsgálat

Caco-2 és Caco-2GRβ sejteket 6-lyukú szövettenyésztő tálcákra 1x10⁶/lyuk sejtszámmal ültettem ki. A kísérletek előtt 24 órán keresztül a sejteket szérummentes médiumban tartottuk. A sejteket 100 nmol DEX-zal vagy vivőanyaggal 8 órát kezeltük. Teljes RNS izolálás RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével, teljes genom mRNS expresszió mérése Agilent44K cDNS microarray-en történt. A méréseket és az eredmények értékelését Agilent DNA Microarray Scanner and Feature Extraction 9.5.3. programmal elemeztük majd a microarray adatok további feldolgozása Genespring GX 12.5 program segítségével történt. Minden kísérletet három biológiai párhuzamos mintán ismételtük meg.

3.6. A *WEE1* 3'UTR feltételezett mikro-RNS kötőhelyének vizsgálata

A *WEE1* gén 3'UTR szabályozó régió szekvenciáját humán genomiális DNS-ből amplifikáltuk 5'-GCTCTAGAGCTACTCCTTTCCACCTCC-3' forward és 5'-GCTCTAGAAAGCTCAGAGTGACTT-TTAATATGCC-3' reverz primerekkel, majd a szabályozó régiót 5'→3' irányban pGL3 Control vektorba (Promega, Madison, USA) építettem közvetlenül a luciferáz kódoló gén 3' vége mögé, XbaI restrikciós hasítóhelyet használva (pWee+). Az ellenkező orientációban (3'→5') beépült 3'UTR régiót használtuk negatív kontrollként (pWee-). A *Wee1* 3' UTR-en kötődő miR-128 és miR-516 kötőhelyek módosítását site-directed mutagenézissel hoztuk létre.

A funkcionális vizsgálatokhoz HeLa sejteket használtunk. A sejtek ko-transzfekciójához 100 nM premiR prekursor (pre-miR miRNA Precursor Molecules: miR-20a, miR-93, miR-128a, miR-155, miR-516a-3p; Ambion Inc, Austin, USA) vagy negatív kontroll prekursor miR-t (Negative Control #2 Precursor miR; Ambion Inc, Austin, USA) és 150 ng vad típusú (pWee+) vagy negatív kontroll (pWee-) firefly luciferáz vektort és transzfekciós kontrollként 150 ng renilla luciferáz vektort (pRL-TK, Promega, Madison, USA) használtam. A transzfektáláshoz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) reagenst alkalmaztunk a protokoll előírásai szerint. A luciferáz assay-t a transzfekciót követően 24 órával mértem Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) segítségével mikrotiter plate olvasón (Appliskan 2.3; Thermo Fisher Scientific, Finland) a megadott paramétereknek megfelelően. A firefly luciferáz aktivitásokat a transzfekciós kontrollként használt renilla luciferáz értékekre normalizáltuk.

3.7. Fehérje expresszió mérések Western blottal

3.7.1. Mikro-RNS prekursorok transzfekcióját követő *WEE1* fehérje expresszió mérése

HeLa sejteket 100 nM pre-miR prekursorral (Ambion Inc, Austin, USA) transzfektáltuk, majd 48 órával később a sejteket 50 µl 2x Laemli Sample Buffer-ben (Bio-Rad, Philadelphia, PA USA) resuszpendáltuk és a teljes sejtlizátumot Western blot-tal analizáltuk. A *Wee1* fehérjét 1:1000 hígítású anti-Wee1 (cat. Nr: 4936; Cell Signaling, Beverly, USA) és 1:7000 hígítású anti-nyúl-tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitesttel (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) mutattuk ki. A membránokat lemosás (30 perc, 0,1M Glicin, pH: 2,6) után egér monoklonális anti-aktin elsődleges (ab8226; Abcam; hígítás 1:2000, Abcam), majd anti-egér tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitesttel (A9917; Sigma-Aldrich; hígítás: 1:20000) inkubáltuk. A fehérjesávokat ECL-Plus reagenssel hívtuk elő (Amersham Biosciences, Pittsburg, USA). A

sávok denzitometriás értékelését QuantityOne 4.6.7 (BioRad) szoftverrel végeztük el, a koncentrációkat az aktin koncentrációjára normalizáltuk.

3.7.2. ***Az áramlási citométerrel szortolt sejtek foszfo-CDC2 és RRM2 tartalma***

A H295R szortolt sejteket Western blot lízis pufferben szuszpendáltuk, majd egyenlő mennyiségeket mértünk a 10%-os poliakrilamid gél zsebeibe, majd Mini Protean elektroforézis kádban (Bio-Rad) választottuk szét a fehérjéket nagyság szerint. Ezt követően egy éjszakányi 4°C hőmérsékleten történő blotolás során polivinildién-fluorid (PVDF) membránra vittük át a mintát, melynek sikerességét Ponceau festéssel verifikáltuk. A membránok blokkolását követően elsődleges nyúl anti-foszfo-CDC2 (Tyr15) antitesttel (Cell Signaling Technology, katalógusszám: 9111, hígítás: 1:500) vagy kecske anti-RRM2 antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-10846, hígítás: 1:200) inkubáltunk. A másodlagos antitestek anti-nyúl (Cell Signaling Technology, katalógusszám: 7074, hígítás: 1:2000) vagy anti-kecske (DAKO, katalógusszám: P0449, hígítás: 1:1000) voltak. Háztartási fehérje β -aktin volt, amit anti- β -aktin antitesttel (Cell Signaling Technology, katalógusszám: 4967, hígítás: 1:2000) detektáltuk.

3.8. **Hormonmeghatározások az NCI-H295R sejtek tápfolyadékából**

A kezeléseket követően a gemcitabin (G) és a mitotán (M) kortizoltermelésre való hatását vizsgáltuk folyadékkromatográfiát követő tömegspektrometriai módszerrel (LC-MS). Az LC-MS mérést Perkin-Elmer Flexar FX10 UHPLC-hez kapcsolt Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométeren, a multiple reaction monitoring mode (MRM) alkalmazásával végeztük.

3.9. **Sporadikus hipofízis, sporadikus mellékvesekéreg és MEN1-hez társult valamint sporadikus mellékpajzsmirigy daganatokon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok**

3.9.1. *Hipofízis szövetekben a WEE1 fehérje kimutatása immunhisztokémiai vizsgálattal és Western blottal*

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz összesen 21 formalinban fixált, paraffinba ágyazott hipofízis szövetmintát használtunk (9 NFA, 7 GH \pm PA, 5 NH). Mikrohullámos antigén feltárást (15 perc, 0,1 mM pH=6 citrát puffer) követően az immunfestés egy éjszakán át 1:100 hígítású anti-Wee1 (ab37597, Abcam, Cambridge, USA), 1:400 hígítású anti-phosphoWee1 (ab60034, Abcam) antitestekkel és anti-nyúl másodlagos antitesttel (Biogenex, San Ramon, CA, USA) történt. Az immunreakció intenzitását 4-es skálán határoztuk meg: 0 (negatív), 1+ (gyenge), 2+ (mérsékelt), 3+ (erős). Az anti-Wee1 antitest specificitását frissen fagyasztott hipofízis szövetmintákban határoztuk meg. A minta homogenizálása után a T-PER Tissue Protein Extraction Reagenssel (Pierce, Rockford, IL, USA) izolált fehérje koncentrációját BCA Protein Assay kittel (Pierce) kvantifikáltuk. Az elektroforézishez mintánként 30 ng teljes fehérjét használtunk 10 %-os poliakrilamid gélben, majd a méret szerint szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át (Millipore, Billerica, MA, USA) semi-dry transfer cell segítségével (BioRad). A Wee1 fehérjét 1:500 hígítású anti-Wee1 (ab37597, Abcam) és 1:7000 hígítású anti-nyúl-tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitesttel (sc-2004; Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, USA) detektáltuk.

3.9.2. *A ribonukleotid reduktáz 2-s alegységének (RRM2) kimutatása mellékvesekéreg- és mellékpajzsmirigy daganatokban*

Az RRM2 a mellékvesekéreg karcinómák proliferációs aktivitásának függvényében való kifejeződését 12 humán mellékvesekéreg-karcinóma szövetmintán vizsgáltuk. A vizsgálatra kiválasztott, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében őrzött, formalinban fixált, paraffinba ágyazott daganatok korábbi, rutin szövettani diagnózisa megerősítette a mellékvesekéreg-karcinóma diagnózist. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a Ki67 proliferációs marker és az RRM2 kifejeződését vizsgáltuk. A detektáláshoz nyúl anti-Ki67 antitesttel (SP6 klón, katalógusszám: RM-9106, Thermo Scientific, hígítás: 1:100), míg az RRM2 kimutatásához kecske anti-RRM2 antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-10846, hígítás: 1:100) végeztük.

3.9.3. *A menin expressziójának vizsgálata mellékpajzsmirigy daganatokban*

A menin fehérje kifejeződését 3-4 μ m vastagságú metszeteken vizsgáltuk. EZ Prep Concentrate 10X (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)-al történt deparaffinálást követően az endogén peroxidáz blokkolása és az antigén feltárást követően (CC1, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) anti-Ki-67 ellenanyaggal (Clone MIB-1) (DAKO, Glostrup, Denmark, Cat. No.: M7240) 1:200-as hígításban 42°C-on 30 percig történt az inkubálás. Hasonló előkészítést követően a menin expresszió méréséhez nyúl poliklonális menin antitestet (Abcam, Cambridge, UK, cat. No.: ab2605) használtunk 1:100-as hígításban 42°C-on 32 percig. Az immunhisztokémiai festés HRP konjugátummal került előhívásra Ventana automatizált rendszerben (Ventana Benchmark XT automate, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A vizualizációhoz UltraView™ Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)-et alkalmaztunk. Pozitív kontrollnak humán hasnyálmirigy és normális mellékpajzsmirigy szöveteket használtunk a menin és nyirokcsomót a Ki-67-es festéshez. Negatív kontrollként az elsődleges antitestek helyett antitest oldószert (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) alkalmaztunk. A Ki-67 és menin immunreaktivitást egy tapasztalt patológus (dr. Borka Katalin, SE. II. Sz. Patológiai Intézet) értékelte. A Ki-67 pozitivitást a magi pozitivitás meglétének arányában

értékeltek, míg a menin fehérje expresszióban mind a magi mind pedig a citoplazmatikus festődés értékelésre került egy 4 pontos skálán (0=nincs festődés, 1=gyenge, 2=közepes, 3=erős).

3.10. Bioinformatikai módszerek

3.10.1. A mikro-RNS-ek és a cél (target) mRNS-ek közötti interakció feltérképezése

A *hipofízis daganatok mikroRNS* expressziója vizsgálata során a mikroRNS-ek cél mRNS-einek azonosításához interneten elérhető programok közül a TargetScan, PicTar és miRBase Targets algoritmusokat használtuk. A potenciális mikro-RNS-ek közül azokat választottuk ki, amelyeket mindhárom program előre jelzett, vagy az adott mikro-RNS több kötőhellyel rendelkezett a *WEE1* 3' UTR régióban. A pGL3 Control plazmid és a miR-155 interakciójának modellezéséhez RNA22 target predikciós programot használtunk, amely tetszőleges beviteli (input) szekvenciák közötti modellezést is lehetővé tesz, a fenti algoritmusokhoz képest, amelyek meghatározott DNS adatbázisok 3'UTR szekvenciáit használják.

A *MEN1* 3'UTR-t célzó mikroRNS-ek beazonosítására öt internetes adatbázis segítségével választottuk ki a *MEN1* gént illetve a menint potenciálisan targetáló mikroRNS-eket. A használt adatbázisok a következők voltak: Diana microT 3.0 URL: <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>, miRWalk URL: <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>, microCosm Targets 5.0 URL: <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>, PicTar URL: <http://pictar.mdc-berlin.de/>, TargetScan URL: <http://www.targetscan.org/>.

3.10.2. Hipofízis daganatok funkcionális genomikai analízise

Az útvonalelemzéshez a TLDA mérések alapján szignifikánsan felülexpresszált mikro-RNS-ek expressziós adatait használtuk a DIANA-mirPath online szoftver segítségével. A target predikcióhoz a TargetScan v5 algoritmust használtuk. A programcsomag mikro-RNS-ekre prediktált multiplex célgénekre „gene set enrichment” analízist végeztünk Pearson's Chi-négyzet próbával majd a mikro-RNS-ekhez prediktált génszettekkel illesztettük KEGG útvonalakhoz. A KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Kanehisa and Goto, 2000) adatbázis különböző genomok tulajdonságait és biológiai rendszerekkel való összefüggését tartalmazza, szisztematikusan rendszerezi a molekuláris és rendszer-biológiai ismereteket.

3.10.3. A GR β fokozott expresszió által befolyásolt gének útvonalelemzése

A teljes genomos génexpressziós mintázatokból a GR β vagy a DEX kezelés során beazonosított mRNS halmazokat és a metaanalízis eredményeit útvonalelemzésnek vetettük alá (Ingenuity Pathway Analysis (IPA)). Az IPA a génexpressziós eredményeket az adatbázisára vetítve jelöli ki az érintett patogenetikai utakat és hálózatokat.

3.10.4. A sejtciklus dependens expressziót mutató gének útvonal elemzése

A sejt szortolás eredményeinek összehasonlítását elvégeztük a korábbi, szinkronizáció-alapú mérésekkel nyert primer humán fibroblasztok szinkronizációs módszerrel vizsgált sejtciklusfüggő génexpressziójának microarray adatai feldolgozásával is. Az adatokat a European Bioinformatics Institute Array Express adatbázisából (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-TABM-263/>), és - a HeLa sejteken végzett vizsgálatának eredmények - a <http://genome-www.stanford.edu/Human-CellCycle/HeLa/> honlapról kerülték letöltésre. A vizsgálatunkhoz a szabadon elérhető DAVID Bioinformatics Resources 6.7 verzióját (<https://david.ncifcrf.gov/>) használtuk. A betöltött génlisták a HeLa sejtciklus szort módszerre specifikus (HeLa SZORT \ HeLa szinkr.), a HeLa szinkronizálás módszerre specifikus (HeLa szinkr. \ HeLa SZORT) és a mindkét vizsgálatban átfedő (HeLa SZORT \cap HeLa szinkr.) sejtciklusfüggő expressziót mutató gének listái voltak. A Bonferroni-korrigált $< 0,05$ p-értékű találatokat tartottuk szignifikánsnak.

3.11. Statisztikai analízis

A genetikai asszociációs vizsgálatok során a Hardy Weinberg egyensúly és a csoportok közötti megoszlások vizsgálatára Chi négyzet vagy Fischer tesztet használtunk. A mennyiségi változók összehasonlításához ANOVA, Student T-teszt, vagy Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk.

Az mRNS és mikro-RNS expressziós microarray mérések kiértékelését GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies) szoftverrel, egyutas ANOVA elemzést követően Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt és Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztük. A TLDA vizsgálatok kiértékelését Real-Time StatMinerTM (Integromics, Granada, Spanyolország) szoftver felhasználásával, egyutas ANOVA módszerrel végeztük. Az újgenerációs szekvenálási eredmények kiértékelését edgeR programcsomag (3.8.6 verzió) használatával, exact T-tesztet követő Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztük. Az univerzális sejtciklus-gének különböző fázisokban való expressziójának ill. a fázisok közötti dinamikus expresszió-változásainak összehasonlításához Student-féle T-próbát alkalmaztunk. Az egyedi qRT-PCR validálások eredményeinek kiértékelése során az egyes csoportok közötti összehasonlításra Student-féle T-tesztet alkalmaztunk. A korrelációs vizsgálatokra Pearson- és Spearman-féle módszereket alkalmaztunk. A sejtenyészetekeken végzett kezelések hatását a proliferációra, a médium kortizol koncentrációra, az apoptózis

arányára, valamint a sejtciklus fázisainak eloszlására vonatkozóan Student-féle T-tesztel vizsgáltuk. Minden összehasonlításban a p-érték $< 0,05$ eredményt fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Kutatómunkám során a hormonrendszer daganatainak a háttérben álló molekuláris mechanizmusok megismerését vizsgáltam. Összehasonlítva egyéb szervekkel **a hormonrendszer daganatai jelentős százalékban alakulnak ki egy-egy örökletes géneltérés talaján**, ami fontos abból a szempontból, hogy mint örökletes kórképek a mutációt hordozók beazonosíthatók és preventív beavatkozásokkal a daganatok megelőzhetőek. Ugyanakkor, kutatási célpontnak is ideálisak, hiszen az adott génhibához társuló molekuláris mechanizmusok megismerését célzó vizsgálatához pontos támpontot és a mutációt hordozó daganatszövetek fontos kutatási mintákat jelentenek. Kutatómunkám két fő pilléren áll: **először molekuláris genetikai vizsgálatokkal beazonosítottuk azokat a hazai betegeket, akik valamilyen örökletes endokrin tumorszindrómában szenvednek**, majd genotípus-fenotípus összefüggések feltárásával új, a klinikai kezelésüket is befolyásoló összefüggéseket ismertünk meg. Az adott szindrómában szenvedők vizsgálatával egyéb, mindezidáig fel nem tárt összefüggéseket határoztunk meg.

Kutatásom során a második pillér **a sporadikus daganatokban** zajló mechanizmusok megismerése volt. Ehhez a feladathoz **integrált adatelemzést**, azaz több szintről származó, legtöbbször az ingyenesen elérhető adatok feldolgozásán alapuló vizsgálatokat is végeztünk, amelyek segítségével szűkítettük a későbbi célzott funkcionális genetikai vizsgálatainkhoz a célpontokat. Ezek a vizsgálatok főleg alapkutatási jellegűek voltak, amelyek révén számos új, molekuláris mechanizmust ismertünk meg. A kapott eredményeim közül számos esetben felmerül a mindennapi klinikai munkában történő alkalmazhatósága, vagy mint új diagnosztikai, és prognosztikai markerek, vagy mint új terápiás célpontok.

4.1. Örökletes endokrin tumorszindrómák patomechnizmusai, genotípus-fenotípus összefüggések

4.1.1. A RET protoonkogén mutációk geno-fenotípus összefüggései MEN2 szindrómában

Összesen 18 családból 40 örökletes medulláris pajzsmirigyrákos (MTC) betegben végeztük el a RET protoonkogén 10-16-os exonok mutációanalízisét, hagyományos, PCR reakciót követő bidirekcionális DNS szekvenálással. Egy betegben a 16-os exon Met918Thr mutációt igazoltuk, ami MEN2B fenotípussal járt. A legnagyobb csoportot (15 család 33 tagja) a MEN2A fenotípus jelentette, amit a 11-es exon mutációk és a 10-es exon Cys609Ser mutáció okozott. A 14-es exon mutációi gyakran csak MTC-vel társultak, egyetlen egy Val804Met mutációt hordozó egyénben igazoltunk primér mellékpajzsmirigy (PHPT) hyperplasiát. Eredményeink összhangban voltak az irodalmi adatokkal, a leg súlyosabb fenotípus, a legagresszívabb MTC a 16-os exon mutációk esetén várható, míg a 10-es és 11-es exonok eltérései során Phaeo és PHPT is a klinikai manifesztációk része.

4.1.2. A VHL gén eltérései hazai von Hippel-Lindau szindrómában szenvedő betegekben

A von Hippel-Lindau (VHL) szindróma egy ritka, több szervet érintő, autoszómális dominánsan öröklődő kórkép. Munkám során a hazai VHL szindrómában szenvedő betegek mutációvizsgálatát végeztük el. Hét család 35 tagja 37 látszólag sporadikus megjelenésű Phaeo-val került kivizsgálásra. Betegség-okozó mutációt mind a hét VHL szindrómában szenvedő családban és 3 Phaeo-s betegben sikerült detektálnunk. A pontmutációk mellett két nagy deléciót és egy 2 bázist érintő deléciót is kimutattunk. A genotípus-fenotípus adatokból kitűnik, hogy a deléciók és Stop kodont eredményező mutációk esetén a VHL szindróma 1-es típusa (nincs Phaeo) a klinikai megjelenés, míg aminosavcserevel járó pontmutációk a VHL szindróma 2-es típusát eredményezik. A kutatómunka során szükséges volt az ún. nagy géndeléciónak detektálásnak kidolgozására is mert a VHL szindrómáért felelős géneltérések kb. 10-15 % ilyen hiba, és ezeket DNS szekvenálással nem lehet azonosítani. Erre kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót és multiplex ligációspróba amplifikációt (MLPA) végeztünk. Esetünkben a hét családból 2 esetben (28,5%) találtunk nagy deléciót, ami megerősítette az irodalmi adatokat és felhívja a figyelmet arra, hogy a molekuláris biológiai módszereket egymással kiegészítve kell alkalmazni a klinikai genetikai vizsgálatok során.

4.1.3. A VHL gén Ser80Ile és a Pro25Leu variánsok patogenetikai szerepének tisztázása

A VHL szindróma genetikai vizsgálata során látóterünkbe került egy több generációs család. A vizsgálatok az index betegben két aminosavcserevel járó mindazidáig nem ismertett génvariáns: AGT80AAT (p.Ser80Ile) c.239G>A, és a CCT25CTT (p.Pro25Leu) azonosított. A család 32 tagjának klinikai és genetikai vizsgálata bebizonyította, hogy ezek közül a Ser80Ile mutáció felelős a betegségért, míg a p.Pro25Leu variáns egy ártalmatlan génpolimorfizmus. A családfa, szekvenciaelemzés, valamint a vad és mutáns fehérjék modellezése is megerősítette eredményünket.

4.1.4. *A szukcinát dehidrogenáz enzim (SDH) alegységeit kódoló gének (SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2: SDHx gének), MAX és a TMEM127 mutációk prevalenciája hazai betegekben*

A Phaeo/PGL genetikai szempontból az egyik legheterogénebb kórkép, eddig 15 gén mutációit igazolták háttérben. Munkám kezdetén először egy SDHD mutációt igazoltunk egy fiatal férfi betegben, akinek egy intraabdominalis PGL-ja volt. A daganat sebészi eltávolítása után a beteg panaszmentessé vált. Később 82 sporadikus Phaeo/PGL-s (a MEN2, NF1 és VHL szindrómák kizárására kerültek) betegben végeztük el az SDHx, MAX és TMEM127 gének vizsgálatát. 11 esetben igazoltunk mutációt, amelyek közül 4 SDHB (SDHB: c.586 T > G; p.Cys196Gly, SDHB: c.586 T > C, p.Cys196Arg; SDHB: c.607G > T, p.Gly203Stop; SDHB: c.728G > A, p.Cys243Tyr) és 1 TMEM127 (TMEM127: c.464 T > A, p.Leu155Stop) mutáció az irodalomban eddig nem ismert, új mutációk. A mutációk klinikai összefüggései közül kiemelendő, a rendkívül rosszindulatú, multiplex metasztázisokkal járó daganatos kép az SDHB mutációk esetében és szintén az SDHB mutáció esetén, egy betegünkben a PGL mellett világos sejtes veserák is kialakult. Eredményeim arra utalnak, hogy Magyarországon nincs ún. alapító mutáció a Phaeo/PGL háttérben, ezért mind a 15 gén mutációvizsgálata indokolt ebben a kórképben.

4.1.5. *Az SDHx gének aminosavcserével járó génvariánsainak fenotípust módosító szerepének tisztázása MEN2-s betegekben*

A SDHx gének egyértelmű betegség-oka szerepe a Phaeo/PGL kialakulásában merült fel. Ugyanakkor számos olyan SDHx génvariáns is beazonosítottak, amelyeknek funkcionális hatásai vannak (pl. a kóros enzimműködés miatt fokozott reaktív oxigéngyök termelődés, felhamozódó szukcinát miatt a hypoxia jelátviteli út aktiválódása, illetve kóros mitokondrium funkció), ami felvetette, hogy ezeknek a variánsoknak esetleg fenotípus módosító hatása lehet több endokrin tumorszindrómában is.

Ezek közül a MEN2 egy ígéretes csoport, hiszen a Phaeo a MEN2 egyik részjelensége, és a penetranciája még családon belül is nagymértékben eltérő. Munkánk során 77 csírasejtes RET mutációt hordozó MEN2 szindrómában (55 MEN2A), 48 sporadikus MTC, 48 sporadikus Phaeo beteg és 100 egészséges egyén vizsgálatát végeztük el az SDHB és SDHD génvariánsok kimutatására. Az elvégzett vizsgálatok az SDHD G12S variáns szignifikáns dúsulását igazolták MEN2As betegekben (8/55) míg sporadikus MTC, sporadikus Phaeo betegben nem tudtuk ezt a variánsot igazolni. Az egészséges kontrollok közül 1 esetben találtuk meg a G12S variánsot. A manifesztációk megjelenése idején az életkor, a szérum calcitonin szintek nem mutattak összefüggést a variánssal. Más, SDHx génpolimorfizmust nem találtunk betegeink között. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy még egy jól ismert monogénes szindróma esetében is lehetnek olyan génvariánsok, amelyek az adott fenotípus módosításában vehetnek részt, valamint a komplex kórképek esetén az egyes manifesztációkkal összefüggő egyéb genetikai eltéréseket is érdemes szűrni.

4.1.6. *Együttesen előforduló SDHC és PTEN mutációkkal társult klinikai fenotípus*

Az Amerikai Egyesült Államokban folytatott kutatómunkám során a Cowden betegség genetikai vizsgálatával is foglalkoztam. Az örökletes daganatszindrómákhoz szorosan kapcsolódik ez az eset ismertetése, ami szintén megerősíti, azt, hogy még az extrém ritkának tűnő szindrómák is társulhatnak egymással és egy beteg akár két örökletes kórképben is szenvedhet. A 43 éves nőbetegben 37 éves korában follikuláris pajzsmirigyrákot, és egy éven belül a bal, majd két év múlva a jobb oldali carotis testet érintő PGL-át diagnosztizáltak. Mindegyik daganatot sikeresen eltávolították, egyéb malignus kórkép nem volt kimutatható. Ugyanakkor az anamnézis során kiderült, hogy méh leiomyomája és fibrocisztás emlődiszplázia miatt is állt már korábban kivizsgálás alatt. Ezek az eltérések macrocephaliával és papilomatózis papulákkal együtt felvetették a Cowden szindróma gyanúját. A genetikai vizsgálat patogén PTEN és SDHC mutációkat igazolt. Esetünk az első dokumentált beteg, akiben az SDHC mutáció mellett egyéb, dominánsan öröklődő tumorszindróma is kialakult. A két örökletes génhibának a betegben és a családjában is fontos következményei vannak, specifikus diagnosztikai eljárások, tumor surveillance, genetikai tanácsadás indokolt.

4.1.7. *Csírasejtes SDHx variánsok hatása Cowden és Cowden-szerű szindrómában szenvedő betegekben*

Szintén az USA-ban végzett és a kutatómunkámhoz kapcsolódó vizsgálat volt a Cowden kórban és Cowden szindrómához hasonló betegségben szenvedők szűrése SDHx mutációkra. Összesen 375 PTEN mutáció negatív CS/CS-szerű szindrómás beteg, analízisét végeztük el. A 375 PTEN negatív eset közül 74 esetben igazoltunk mitokondrium diszfunkciót, az emelkedett MnSOD expresszióval. Ezek közül 10 (13.5%) esetben csírasejtes SDHB és SDHD génvariánsot mutattunk ki. A PTEN mutációt hordozó CS/CS-szerű betegekhez képest az SDHx génvariánsokat hordozók között gyakoribb volt az emlőrák, a pajzsmirigyrák és a veserák előfordulása. Eredményeink megerősítik az SDHx génvariánsok hajlamosító szerepét különböző szolid tumorok kialakulására. Az SDHx variánsok funkcionális genetikai vizsgálata megerősítette szerepüket a kóros mitokondrium funkcióban, az AKT és MAPK jelátviteli utak aktiválódásában.

4.1.8. *A szukcinát hatásainak összegzése a tumorigenézisben*

Mindezek a korábbi genetikai eredmények felvetik, hogy az SDH enzim csökkent működése összetett szerepet játszik a tumorigenézisben. Összefoglaló tanulmányt készítettünk a biokémiai hatásokról, és a szukcinát felhalmozódás következtében kialakuló egyéb útvonalak aktivitásáról és ezek potenciális szerepéről a

daganatképződésben. A bemutatott összefüggések modellezése a jelenlegi kutatómunkánkhoz szükséges hipotézisek felállításában is segített.

4.1.9. *A MEN1 szindrómáért felelős MEN1 mutációk beazonosítása és a genotípus-fenotípus összefüggések hazai betegekben*

A MEN1 szindróma molekuláris genetikai analízisét a SE II. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Genetika Laboratóriumában végeztük el, összesen 19 család 32 betegében. Ezekben az esetekben a klinikai diagnózis MEN1 szindróma volt. Összesen 10, különböző *MEN1* génmutációt igazoltunk, amelyek közül 4 (A91V, G28A, E26X és az L301R) új mutáció volt. A családi halmozódást mutató esetek mindegyikében (6/6) kimutattuk a betegséget okozó eltérést, míg a sporadikus megjelenésű MEN1 szindrómában szenvedők mintegy 23%-ában (3/13). Eredményeink megerősítik azokat az irodalmi adatokat, hogy a familiáris előfordulás bír a legnagyobb erővel a betegségért felelős génhiba igazolása vonatkozásában.

4.1.10. *MEN1 szindrómában előforduló mellékvesedaganatok valamint a menin szerepe a mellékvesekéreg daganatok patogenezisében*

Mivel a menin tumoszuppresszor fehérje szerepe a daganatképződés mechanizmusában mai napig nem kellően tisztázott többször is kutatómunkám előterébe került. Számos összefoglalást készítettünk abból a célból, hogy a saját kísérletes munkánkhoz is kiindulási pontokat, hipotéziseket állítsunk fel. Igazolni látszik, hogy a meninnek a mellékvesekéreg adenómák kialakulásában csekély a szerepe, a korábbi összefüggések, amelyek azt sugallták, hogy a meninnek a mellékvesekéreg daganatokban lényeges szerepe lenne, inkább tűnnek egyszerű koincidenciának. Saját beteganyagunkban a *MEN1* mutáció előfordulására a mellékvesedaganatok jelenléte nem bírt pozitív prediktív értékkel. Ezt számos munkacsoport szintén megerősítette. A mellékvesedaganatok genetikai vizsgálata nem vetette fel a *MEN1* gént, mint mutációs hotspot-ot, ami szintén arra utal, hogy ezen daganatok kialakulása nem *MEN1*-dependens módon történik. Ugyanakkor fontos kiemelni azt is, hogy a menin számos olyan fehérjével kerül interakcióba, amelyek szerepe bizonyított a tumorigenezisben, továbbá a sejtciklushoz kapcsolódó eltérések a mellékvesedaganatok jellemzői, igaz elsősorban a rosszindulatú mellékvesekéregtráké.

4.1.11. *Nemzetközi együttműködés során igazolt genotípus-fenotípus összefüggések MEN2 szindrómában és örökletes Phaeo/PGL-ákban*

Az örökletes endokrin tumorszindrómák ritka kórkepek. Egyetlen ország sem képes olyan számú beteg feldolgozására, ami elegendő statisztikai erőt jelentene a genotípus-fenotípus összefüggések pontos meghatározására. Kutatómunkám során fontos célom volt résztvenni olyan nagy esetszámú vizsgálatokban, amelyek biztosították a releváns összefüggések felismerését. A RET TGC634TGG (p.Cys634Trp) mutációt hordozó MEN2 szindrómás esetek feldolgozásával először határoztunk meg kodon, mutáció specifikus genotípus-fenotípus összefüggéseket. Összesen 92 esetet (20 családból) sikerült beazonosítani amerikai és európai centrumokban. 68 esetben az MTC diagnózisa volt az első eltérés, átlagosan a 29. életévben. A betegek közül 16 esetben nyirokcsomó, 4 esetben távoli metasztázis is igazolódott. Phaeochromocytoma 41 esetben manifesztálódott (átlagosan a 36. életévben). Hat esetben a Phaeo megelőzte az MTC kialakulását. Primer mellékpajzsmirigy adenoma csak 6 esetben volt kimutatható. Nyolc beteg Phaeo, 4 beteg MTC miatt hunyt el. Az MTC penetranciája a 30. életévre 52%, de az 50. életévben már 83 % volt. A Phaeo esetében a 30. életévben 20%, az 50. életévben 67%, míg a PHPT penetranciája mindössze 3% a 30. életévben és 21% az 50. életévben. Ezek az adatok bizonyítják, hogy MEN2 szindrómában a mutáció-specifikus összefüggéseknek az ismerete biztosítja a betegek és a mutációt hordozók legjobb túlélését.

Kiterjesztve az első vizsgálatunkat, ugyanebben a konzorciumban elvégeztük az összes *RET* 10-es exon mutációt hordozó feldolgozását. A nemzetközi *RET* Exon 10 Konzorcium keretében 15 ország 27 centrumában 103 család 340 érintettjét elemeztük. Összesen 21 különböző *RET* mutációt detektáltunk. MTC 263 érintettben, Phaeo 54 és PHPT 8 esetben manifesztálódott. Az MTC-vel diagnosztizált esetek 53%-a, a Phaeo-s esetek 54%-a klinikai tünetmentes állapotban, a szűrések következtében kerültek felismerésre. Az MTC-re kodon specifikus penetranciát és rizikóbecslést lehetett meghatározni, ami igazolta, hogy a metasztázis megjelenése összefügg az érintett kodon mutációval (a 609-es kodon mutációk esetén a legkisebb míg a 620-as kodon esetén a legnagyobb a metasztázis rizikója).

A phaeochromocytómákkal kapcsolatban az Európai-Amerikai-Phaeochromocytoma-Paraganglioma-Register 2001 betegének feldolgozásával két lényeges kérdésben foglalmaztunk meg szakmai javaslatokat. Az egyik a 18 évesnél fiatalabb betegek vonatkozásában. A 177 regisztrált eset közül, a betegek 80%-a hordozott csírasejtes mutációt (49% *VHL*, 15% *SDHB*, 10% *SDHD*, 4% *NF1* és egy betegben *RET*, *SDHA* és *SDHC* eltérés is kimutatható volt). Második daganat az esetek 38%-ában jelentkezett, az életkor előrehaladtával nőtt ennek az esélye, a 30. életévre elérve az 50%-ot. A második daganat megjelenése *VHL* és *SDHD* mutációt hordozókban volt a legvalószínűbb. Malignus daganatokat 16 esetben (9%) igazoltunk, melyek *SDHB* mutációkhoz társultak. Az átlagos várható élettartam 62 év volt az örökletes esetekben.

Az utolsó két nagy vizsgálat témája a phaeochromocytóma volt. Elsőként a MEN2 szindrómában kialakuló Phaeo kezelésére vonatkozó adatokat elemeztük egy multicentrikus vizsgálat keretein belül. Összesen 1210 MEN2 szindrómában szenvedő beteg adatait dolgoztuk fel. 563 esetben alakult ki Phaeo, akik

közül 552 beteg esett át sebészi kezelésen. 438 (79%) esetben adrenalectomia, 114 (21%) betegben mellékvesekéreg-megtartásával történt a műtét. Rekurrens Phaeo az esetek 3 és 2%-ában fordult elő. Mellékvesekéreg-elégtelenség és glükokortikoid pótlásra a 339 kétoldali Phaeo-s beteg közül 292 (86%) esetben volt szükséges, míg a 82 kétoldali, mellékvesekéreg-megtartásával műtött beteg közül 47 esetben (57%) nem alakult ki mellékvesekéreg elégtelenség. Eredményeink igazolják, hogy MEN2 szindrómában, ahol várható a kétoldali daganatok kialakulása, a mellékvesekéreg-megtartó műtétek végzése javasolt a későbbi mellékvesekéreg elégtelenség elkerülésének érdekében.

A második vizsgálat az újonnan azonosított Phaeo/PGL gének variánsai gyakoriságát és klinikai manifesztációkkal történő asszociációit célozta. Összesen 972 sporadikus Phaeo/PGL-val diagnosztizált betegben kerültek vizsgálatra az új gének (*MAX*, *TMEM127*, *SDHA*, *SDHAF2*). 58 (6.0%) esetben került beazonosításra mutáció valamelyik új génben (29 *SDHA*, 20 *TMEM127*, 8 *MAX* és 1 *SDHAF2*). Az 58 eset közül 53 esetben a daganat familiáris vagy multiplex vagy extra-adrenalis vagy malignus volt. Szintén nagyon fontos klinikai megfigyelés volt, hogy ezek a betegek 40 évesnél fiatalabbak voltak. Legfiatalabb életkorban (8 évesen) *SDHA* mutáció talaján alakult ki daganat. Extra-adrenalis tumor is gyakori volt *SDHA* mutációkhoz társulva (23/29 *SDHA* hordozóban; 79%). *MAX* mutáció mellékvesére lokalizált Phaeo-ra volt jellemző. A konzorcium állásfoglalása alapján az újonnan felfedezett gének mutáció analízise is indokolt Phaeo/PGL-s betegekben, elsősorban a fiatal, malignus, familiáris vagy multiplex daganatok esetében. Génspecifikus tanácsadás, folyamatos klinikai nyomonkövetés és genetikai tanácsadás javasolt ezekben a családokban.

4.2. Sporadikus daganatokban igazolt genetikai, epigenetikai eltérések és az ezekhez társult pathomechanizmus

4.2.1. *A C4B gén kópiaszámának hatása valamint a CYP21A2 gén gyakori variánsainak hatása az ACTH stimulációt követő kortizol válaszra jóindulatú mellékvesekéreg adenómás betegekben*

A fokozott glükokortikoid hatás szerepének jobb megértéséhez a jóindulatú mellékvesekéreg adenómás betegek további vizsgálatait során a *CYP21A2* gén tágabb majd egyre finomabb felbontású genetikai asszociációs vizsgálatait végeztük el. A *CYP21A2* gén patogén mutációi a 21-hidroxiláz enzimdefektust okozzák, ahol az enzim különböző mértékű károsodása jön létre. A *CYP21A2* genomi lokalizációja rendkívül bonyolult, ún. kópiaszámváltozásokat mutató szakaszokon található. A régió egyik tagja a komplement komponens 4-t kódoló *C4B* gén is. A *C4B* gén egyik haplotípusáról (*C4B*Q0*) ismert volt, hogy összefüggést mutatott különböző kardiovaszkuláris megbetegedésekkel. Mivel a mellékvesekéreg-hormonok közül a kortizol és aldosteron is szerepet játszik a vérnyomás és szívműködés szabályozásában és a *C4B*Q0* összefügghet a *CYP21A2* génnel, további vizsgálatokat végeztünk. Munkánk során feltételeztük, hogy a korábbi hatásokért ennek az enzimnek a genetikai variánsai tehetők felelőssé. Vizsgálatainkhoz olyan betegeket vontuk be, akiktől rendelkezésre álltak alap és stimulált hormonvizsgálati eredmények. Összesen 77 mellékvesekéreg adenómás beteget vizsgáltunk. Igazoltuk, hogy az alap és az ACTH-stimulált kortizol koncentrációk is szignifikánsan magasabbak voltak a *C4B*Q0* hordozókban, mint a nem hordozókban. Az eredmények függetlenek voltak a nemtől, életkortól és a daganat méretétől. Hasonló eredményt igazoltunk az ACTH-stimulált és alap aldosteron hányados között is. Eredményeink arra utaltak, hogy a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely hiperaktivitása összefügg a *C4B*Q0* haplotípussal.

A második vizsgálatunk során a *CYP21A2* génvariánsokra fókuszáltunk. A gén bonyolult kromoszomális szerkezete miatt speciális molekuláris biológiai módszereket (allél-specifikus long range PCR, MLPA, kvantitatív PCR) használtunk a *CYP21A2* haplotípusizálásához. A beteg populációt a *CYP21A2* génvariánsok alapján három nagy haplotípusba lehetett sorolni. Ezek közül az ún. c5 haplotípusba tartozókban emelkedett kortizol és 17-hidroxiprogesteron mértékét ACTH-stimulációt követően, míg az rs6462 polimorfizmust hordozókban az aldosteron koncentráció volt emelkedett. Eredményeink tovább erősítik azt a feltételezést, hogy a *CYP21A2* gén gyakori variánsainak szerepe lehet HPA tengely szabályozásában, egyes haplotípusai fokozott rizikót jelentenek a markánsabb stresszválaszra.

4.2.2. *A GR N363S variánsának szerepe jóindulatú mellékvesekéreg adenómák patogenézisében, új PCR módszer a GR gén BclI polimorfizmus kimutatására*

A jóindulatú mellékvesekéreg adenómák gyakori eltérések. Háttérük tisztázatlan, de a kétoldali megjelenés és a betegek hormonvizsgálatai felvetették, hogy patogenézisükben a károsodott glükokortikoid hatásnak szerepe lehet. A GR gén gyakori polimorfizmusai közül az N363S a fokozott glükokortikoidok iránti érzékenységgel mutatott összefüggést. Vizsgálataink költséghatékony módon történő kivitelezéséhez a GR polimorfizmusok vizsgálatához allél-specifikus PCR-t terveztünk, így egy csőben a normális és mutáns allélok gyorsan és olcsón kimutathatóakká váltak. A módszert Sanger szekvenálással validáltuk. A GR N363S variánsa szignifikánsan gyakoribb volt a kétoldali mellékvesekéreg adenómás betegekben, mint az egyoldali, vagy diabeteses vagy kontroll csoportban (20,5% vs. 7,1%, 13% és 7,1%). A 2-típusú diabetes gyakoribb volt a kétoldali adenómás csoportban, mint az egyoldali adenómások között (40,9 vs. 22,2%, $P < 0,05$). Ebben a csoportban az N363S variáns összefüggést mutatott a károsodott cukoranyagcserével, de a BMI, hyperlipidémia, magasvérnyomás vagy koronária betegséggel nem társult. Eredményeink arra utalnak, hogy a GR N363S polimorfizmusa a

szénhidrát anyagcserén keresztül szerepet játszik a kétoldali, hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenómák patogenezisében.

4.2.3. *Nagy áteresztőképességű módszerek integrálása, funkcionális kapcsolatok modellezése*

Kutatómunkám egybeesett a molekuláris biológiai módszerek rohamos fejlődésével. A nagy áteresztőképességű vizsgálatok (microarray, új generációs szekvenálás) és ezek eredményei ingyenesen elérhető adatbázisokban történő elhelyezése lehetővé tette, hogy a vizsgálataink tárgyát képező ritka betegségekről is elérhető mérési eredményeket hasznosítani tudjuk. Az integratív adatelemzés és ezek átültetése a klinikai gyakorlatba vezetett oda, hogy kidolgozzunk egy olyan munkafolyamatot, ami tartalmazza az adatelemzést, az irodalmi adatok feldolgozását, a validációs kísérletek tervezését és a funkcionális módszerek integrálását. A kidolgozott stratégiát sikeresen alkalmaztuk a hipofízis és a mellékvesekéreg daganatok elemzésében.

4.2.4. *A GR-t kódoló gén izoformáinak szerepe mellékvesekéreg daganatokban*

A genetikai asszociációs vizsgálatokból körvonalazódott, hogy az intraadrenalis glükokortikoid érzékenység szerepet játszik a jóindulatú mellékvesekéreg adenómák patogenezisében. Kimutattuk, hogy a GR izoformái expresszálódnak a mellékvesekéregben és a mellékvesekéreg adenómákban. A legmagasabb expressziót a kortizolt termelő adenómákban mutattuk ki. A GR β izoforma szintén detektálható volt a mellékvesekéreg szövetmintákban, a legmagasabb expresszió szintén a Cushing szindrómát okozó adenómákban volt detektálható. A GR α és a GR β izoforma jelentős emelkedése egy a mellékvesekéregben kialakuló glükokortikoidok iránti rezisztencia mechanizmusra utalnak.

4.2.5. *A mellékvesekéregben működő perifériás óra és a GR izoformák szerepe ennek modulálásában*

A GR izoformák funkcióinak megértése érdekében számos kísérletet végeztünk. Mivel a mellékvesekéreg hormonok esszenciális szerepet játszanak a napszaki ritmus szabályozásban, első kérdésünk arra irányult, hogy a GR szerepet játszhat a perifériás óragének szabályozásában. qRT-PCR-el igazoltuk, hogy az óragének expresszálódnak a mellékvesekéregben és ritmusos ingadozást mutatnak. A glükokortikoid kezelés az óragének ritmikus expressziójának eltolódását okozta. A GR β fokozott expressziója az NR1D1 kofaktor expresszióját befolyásolta, aminek szerepe lehet a tápanyagellátás és a glükokortikoid jelátviteli utak szinkronizálásában. Mindezek az eredmények bebizonyították, hogy a mellékvesében egy intakt perifériás óra működik, a hormonhatásnak pedig erre hatása van. A H295R mellékvesekéregreál sejtvonal alkalmas az óragénekkal kapcsolatos kutatások elvégzésére.

4.2.6. *A GR β izoforma szerepe a géntranszkripcióban*

A GR β hatásának tisztázására létrehoztunk egy sejtvonalat, ami fokozott mértékben expresszálja ezt az izoformát. Génexpressziós vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a GR β domináns negatív hatással bír a GR α által szabályozott génekre, de olyan gének transzkripcióját is befolyásolta, ami a GR α -tól független volt. Sejtvonalunk eredetileg egy bélhámsejt volt, így lehetőségünk volt arra, hogy elemezzük azt, hogy a GR β által regulált géneknek milyen szerepe lehet a gyulladásos bélbetegségekben. Integratív adatelemzést végeztünk a gyulladásos bélbetegségben szenvedőkből elérhető génexpressziós adatokon, és ezeket összevetettük a GR β által szabályozott génekkel. A közös halmazban olyan gének voltak, amelyeknek a sejtadhézióban, a sejt-sejt interakcióban van szerepe. A génexpressziós array-ek adatait egyedi qRT-PCR-el validáltuk. Mindezek alapján a glükokortikoidok iránti rezisztencia a GR β emelkedett expressziója révén is szerepet játszhat a gyulladásos bélbetegségben igazolt mechanizmusok kialakulásában, új célpontokat mutattunk ki, amelyek előre jelezhetik a szteroid rezisztenciát gyulladásos bélbetegségben.

4.2.7. *A hipofízis daganatok mikro-RNS expressziós mintázata*

Hipofízis szövetekben a teljes genomot lefedő mikro-RNS-expressziós profil vizsgálatával olyan mikro-RNS-eket azonosítottunk, amelyek vizsgálata segítheti a daganattípusok, sokszor szövettani vizsgálattal sem egyszerű azonosítását. Megállapítottuk, hogy a nem-funkcionáló hipofízis adenómákra (NFA) általánosságban fokozott, míg a növekedési hormont termelő daganatokra inkább csökkent globális mikro-RNS expresszió jellemző. Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy az NFA daganatok heterogenitása miatt számos jelátviteli út vagy ugyanazon út, de különböző szabályozási szinteken lehet érintett. E daganatok heterogenitását mind a patológiai, mind a korábbi génexpressziós és mikro-RNS-expressziós vizsgálatok is alátámasztják. Következő kísérletünkben 12 hipofízis szövet (8 NFA és 4 NH) mikro-RNS expressziós profilját határoztuk meg preamplifikációval kiegészített TaqMan Low Density Array segítségével. Öt mikro-RNS (miR-198, miR-299-5p, miR-497*, miR-548c-3p, miR-622) csak a normális hipofízisben, míg 3 mikro-RNS (miR-124*, miR-515-5p, miR-872) csak a NFA mintákban volt jelen kimutatható mennyiségben. A mindkét csoportban expresszálódnak 478 mikro-RNS közül az NFA mintákban 92 mikro-RNS legalább kétszeresre növekedett, 70 mikro-RNS pedig legalább felére csökkent expressziót mutatott a normális hypophysis szövethez viszonyítva. Hierarchikus cluster analízissel a daganatos és az ép szövetminták egymás mellé rendeződtek. A szignifikánsan túlexpresszált mikro-RNS-ekkel a DIANA-mirPath szoftver segítségével **végzett**

útvonalelemzés 63 jelátviteli útvonalat azonosított, amelyek közül a sejtciklus és a TGF β útvonalak elemzését részletesen is elvégeztük.

4.2.8. **TGF β útvonal mikro-RNS-ek általi szabályozása hipofízis daganatokban**

A legjelentősebbnek tűnő jelátviteli útvonalak között szerepel a TGF β jelátviteli útvonal 205 mikro-RNS-mRNS interakcióval 51 gén és 39 mikro-RNS között. A 39 mikro-RNS-ből 19 mikro-RNS önmagában is szignifikáns hatással bírhat a TGF β útvonalra

Validálás során a TGF β jelátvitel vizsgálatához 10 normális és 10 NFA szöveten qRT-PCR-rel meghatároztuk a nyolc ismert Smad molekula (Smad1-9) expresszióját, amelyekről feltételeztük, hogy funkciózavaraik szerepet játszanak a daganatképződés folyamatában. Kimutattuk, hogy a Smad3, Smad6 és Smad9 expressziója hipofízis adenoma mintákban szignifikánsan csökkent az ép szövethez képest. A Smad3 a TGF β jelet közvetíti, a Smad6 és Smad7 pedig gátolja mind a TGF β , mind a BMP útvonalak jelátvitelét. Bár a Smad6 expressziója NFA mintákban szignifikánsan csökkent, a Smad7 szintje nem változott. A BMP jelet közvetítő Smad molekulák közül a Smad1 és Smad5 expressziójában nem igazoltunk különbséget, míg a Smad9 szignifikánsan csökkent expressziót mutatott a daganatokban az ép szövethez képest. Ugyanazon mintákon elvégzett miR-TLDA expressziós mintázat és 5 különböző target predikciós program segítségével 19 miR-t azonosítottunk, amelyek NFA szövetben szignifikánsan negatív korrelációt mutattak a Smad3 expressziójával és ugyanezen szövetekben expressziójuk fokozott volt. Ezek közül a miR-140 és a Smad3 mRNS közötti interakciót riportergén vizsgálattal már korábban bizonyították. Mindezen eredmények alapján megállapítható, hogy a mikro-RNS-ek által közvetített poszttranszkripció szabályozás nagy valószínűséggel befolyásolja a TGF β jelátviteli útvonal tagjainak expresszióját, amelyeknek szerepe lehet nemcsak a hipofízis daganatok kialakulásában, hanem a normális hipofízis szövet működésében is.

4.2.9. **Emelkedett expressziót mutató mikro-RNS-ek szerepe a WEE1 kináz szabályozásában**

A hipofízis adenomákban fokozottan expresszált mikro-RNS-ek lehetséges célpontjai közül a bioinformatikai algoritmusok felvetették a sejtciklus kináz WEE1 fehérjéjének kiemelt szerepét. Hipofízis szövetekben a WEE1 expresszióját mRNS és/vagy fehérje szinten elemezve kimutattuk, hogy a WEE1 fehérje mind a hormonálisan inaktív mind pedig a növekedési hormont termelő szövetekben csökkent expressziót mutatott az ép szövethez képest, de mRNS szinten ez nem volt igazolható, ami felvetette a WEE1 poszttranszkripcionális mikro-RNS-ek általi szabályozásának lehetőségét. A WEE1-t célzó mikro-RNS-ek azonosítása céljából *in silico* target predikciót, majd az *in silico* kutatásokkal feltárt lehetséges mikro-RNS-ek közül 5 potenciális miR-t (miR-128a, miR-516a-3p, miR-155, miR-20a, miR-93) validáltunk. Az elvégzett riportergén kísérlet alapján a miR-128a, a miR-155 és a miR-516a-3p szignifikánsan csökkentette a luciferáz aktivitást a *WEE1* 3'UTR régiójával való direkt interakció révén. A miR-128a és a miR-516a-3p esetében irányított mutagenézissel sikerült bizonyítani a programok által jelzett kötőhelyek működőképességét, míg a miR-155 esetében az alap-plazmidaal való interakció miatt ennek bizonyítása nem volt lehetséges. A három mikro-RNS együttes transzfekciójával a WEE1 fehérje mennyisége az eredeti mennyiség 18%-ára csökkent. A mikro-RNS-mRNS interakció bizonyítása után a mikro-RNS-ek hatását nemcsak a reporter konstrukcióra, hanem HeLa sejtek endogén WEE1 fehérje expressziójára is sikerült kimutatni. Mindezek az eredmények igazolják, hogy a fokozott expressziót mutató mikro-RNS-ek célozzák és csökkentik a WEE1 fehérje expresszióját hipofízis daganatokban, ami a G2/M átmenet rendellenességére utal.

4.2.10. **A sejtciklus G2/M átmenetében szerepet játszó mikro-RNS-ek szerepe hipofízis daganatokban**

A korábbi eredményeink alapján folytattuk a G2/M átmenet szisztematikus elemzését hipofízis daganatokban. Igazoltuk, hogy a WEE fehérjével ellentétes hatást okozó CDC25A és CDC25C fokozott expressziót mutat az NFPA szövetekben az ép hipofízishez képest. A miR-503 és a miR-424 alulexpresszáldók ugyanezekben a szövetekben és direktan célozzák a CDC25 3'UTR-t. Eredményeink alapján a sejtciklus G2/M átmenetében kulcsfontosságú két molekulacsoport (WEE1 és CDC25) komplex, mikro-RNS-ek általi szabályozás alatt is állnak, amelynek a hormonálisan inaktív hipofízis daganatok pathomechanizmusában lehet szerepe.

4.2.11. **A sejtciklusfüggő ingadozást mutató gén és mikro-RNS expresszió vizsgálata, új áramlási citometriás módszer kidolgozása a sejtek sejtciklus szerinti sejtválogatására**

Munkánk során kidolgoztunk egy új, áramlási citometrián alapuló sejt szortolási módszert. Az optimalizált sejtciklus szortolás sikeresen és nagy tisztasággal izolálta a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejteket HDFa, NCI-H295R és HeLa tenyészetekből. Az egyes sejtciklusfázisok specifikus kiválogatása a különböző sejt típusokban változó volt, de minden esetben meghaladta a korábbi, szinkronizálási módszerekkel nyert eredményeket. Minden sejt típusban a G1 fázis szortolása sikerült a legnagyobb tisztasággal, míg NCI-H295R és HeLa sejtekben az S fázisba szortolt sejtek tisztasága meghaladta a G2 fázis tisztaságát. Validálásként Western blot segítségével a CDC2 Tyr15-os foszforiláltságának változását ellenőriztük a szétválogatott sejteken, ami megerősítette az áramlási citométeres módszer hatékonyságát.

Korábban számos kifogást fogalmaztak meg a szinkronizálási módszerekkel a sejtciklusfüggő transzkripció program vizsgálatában való alkalmazásával kapcsolatban ezért összehasonlítottuk sejt típusonként a sejtciklus szort módszerrel nyert eredményeket a korábbi, szinkronizálási módszerekkel nyert eredményekkel. Az

összehasonlítás során jelentős átfedést találtunk a sejtciklus szort és a szinkronizálási módszereken alapuló eredmények között, valamint – mind primer fibroblaszt, mind HeLa sejtek esetében – szignifikáns korrelációt találtunk a két módszer eredményei között. Továbbá, HeLa sejtek esetében a csak szinkronizálással sejtciklusfüggőnek imponáló gének által meghatározott biológiai útvonalak igazolták a szinkronizálás okozta replikációs stressz következményeit, mely nem volt jelen a sejtciklus szerinti sejtválogatással nyert gének által meghatározott biológiai útvonalak között.

Három nagyáteresztőképességű technikát (microarray, qRT-PCR alapú TLDA, Illumina kis RNS szekvenálás) alkalmaztunk a sejtciklusfüggő mikro-RNS expresszió vizsgálatára. Bár a különböző módszerekkel kapott eredmények néhány mikro-RNS-t felvetettek, mint sejtciklusfüggő módon expresszáldódó, egyedi qRT-PCR módszerrel validálni egyiket sem sikerült, ami arra utal, hogy a mikro-RNS expresszió stabil a sejtciklus során.

4.2.12. *Sejtciklusfüggő módon expresszáldó új biomarker a mellékvesekéreg-rák prognózisában*

A mellékvesekéreg-karcinóma malignitás mintázatát összehasonlítottuk az NCI-H295R sejtciklusfüggő transzkripció programjával. Összesen 1752 gén mutatott szignifikáns, legalább kétszeres expressziós különbséget ACA és ACC között, míg az S/G1 összehasonlításban 29 gén expressziója változott dinamikusan. A két halmaz metszetének tagjai közül az RRM2 (ribonukleotid reduktáz M2 alegység) és az ASPM (abnormális orsó-homológ, microcephalia-asszociált) gének voltak felülexpresszáva mindhárom ACC vs. ACA microarray tanulmányban, emellett az RRM2 mutatta a legmagasabb génexpressziós különbséget S vs. G1 összehasonlításban. Ezt követően tizenkét, szövettanilag igazolt humán ACC-n végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat az RRM2 és Ki67 fehérjék meghatározásának irányában. Szignifikáns, szoros korrelációt mutattunk ki a Ki67 index és az RRM2 score között, ami arra utal, hogy az RRM2 jó proliferációs marker ACC-ben.

Megvizsgálva az RRM2 expressziót az ACC-ben alkalmazott kemoterápiás szerek alkalmazásának függvényében igazoltuk, hogy mind a mitotán, 9-cisz-retinsav és a gemcitabin is csökkentette az NCI-H295R sejtek proliferációját. A mitotán kezelés nagymértékben csökkentette az NCI-H295R sejtek kortizoltermelését, ugyanakkor a gemcitabin alkalmazása nem befolyásolta ezt. A gemcitabin alkalmazása növelte a G1-fázisú sejtek arányát mindhárom kezelési időpontban. A mitotán és a 9-cisz-retinsav, valamint különösen a kettő kombinációjának alkalmazása szignifikánsan emelte a G2-fázisú sejtek arányát a 24 órás kezelés során.

A gemcitabin – a kezelési időtől függetlenül – háromszorosára emelte az RRM2 mRNS szintjét NCI-H295R sejtekben és a 48 órás minták fehérjelizátumain végzett Western blot vizsgálatok igazolták a gemcitabin RRM2 expressziót fokozó hatását fehérjeszinten is. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a gemcitabin kezelés következtében létrejövő RRM2 expresszió-fokozódás egy gemcitabinnal szemben kialakuló kemorezisztencia következménye. Ez magyarázhatja a gemcitabin relatív hatástalanságát az ACC terápiájában.

4.2.13. *A keringésben jelen lévő mikro-RNS-ek mint biomarkerek a hormonrendszer betegségeiben, a miR-483-5p a mellékvesekéreg-rák specifikus markere*

A mellékvesekéreg-rákban a miR-483-5p fokozott expressziója igazolódott, mind a daganatszövetekben, mind a karcinómás betegek plazmájában. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a miR-483-5p tumormarkerként viselkedik mellékvesekéreg karcinómában. A mellékvese régióban kimutatott térfoglalás klinikai és laboratóriumi kivizsgálása során számos hormonmérésre, endokrin tesztre kerül sor. Nem állt rendelkezésünkre adat arra vonatkozóan, hogy ezek tesztek a mikro-RNS-ekre milyen hatással bírnak. Munkánk során igazoltuk, hogy a mellékvesedaganatos betegek kivizsgálása során alkalmazott dexametazon és ACTH-tesztek nem befolyásolták a keringésben jelen lévő miR-483-5p szintjét, így tumormarkerként történő potenciális alkalmazása továbbra is lehetséges.

4.2.14. *Menin expresszió és a MEN1 3'UTR-t potenciálisan célzó mikro-RNS-ek szerepe mellékpajzsmirigy daganatokban*

A menin sejtmagi hiányát mindegyik MEN1 szindrómához társult mellékpajzsmirigy adenómában és a 40 sporadikus adenóma közül 11-ben (27.5%) igazoltuk. Az összes menin-negatív daganat közül 23 esetben (16 örökletes, MEN1-hez társult és 7 sporadikus eset) mutattunk ki MEN1 mutációt. A MEN1 3'UTR-t célzó hsa-miR-24 és potenciálisan célzó hsa-miR-28 expressziója magasabb volt a sporadikus, nem-szindrómás esetekben a MEN1-hez társult esetekhez viszonyítva. A vizsgált mikroRNS-ek expressziója nem tért el a menin-negatív és menin-pozitív esetek között. Mindezek alapján, a mellékpajzsmirigy daganatokban a MEN1 mutációja tehető felelőssé a daganatok kialakulásáért, de a csírasejtes menin deficiencia a hsa-miR-24 és hsa-miR-28 expresszióját csökkentheti, ami felveti a menin, mint transzkripció faktor esetleges szerepét.

5. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Genetika Laboratóriumában elérhetővé tettük a legtöbb monogénesen öröklődő endokrin tumorszindrómáért felelős gén molekuláris biológiai vizsgálatát. A hagyományos DNS szekvenálás mellett szükséges volt kidolgozni és bevezetni olyan bonyolultabb módszereket (long-range PCR, MLPA) is, amelyek szükségesek voltak a tumorsupresszor gének heterozigóta (hemizigócia) formában előforduló deléciói kimutatására, vagy pl. a több kópiaszám variációt mutató *CYP21A2* gén teljes genotipizálásához.
2. MEN2 szindrómában kimutattam a patogén *RET* mutációkat, a genotípus-fenotípus összefüggések alapján egyénre szabott terápiás beavatkozásokat, preventív pajzsmirigyműtéteket javasoltunk
3. Feltérképeztem és genetikailag jellemeztem a hazai von Hippel-Lindau szindrómában szenvedő betegeket. MLPA vizsgálat bevezetésével új, addig genetikailag negatív eseteket azonosítottam be.
4. A *VHL* gén Ser80Ile mutációjáról kimutattam, hogy patogén eltérés.
5. Az örökletes pheochromocytóma/paraganglióma szindrómák háttérében álló mutációs spektrum azonosítása révén, elsőként azonosítottunk hazai betegben extraadrenalis PGL háttérében *SDHD* mutációt, és elsőként igazoltuk, hogy az *SDHD* gén G12S polimorfizmusa gyakrabban fordul elő MEN2A szindrómában, mint egyéb *RET* génhibákhoz társuló kórképekben.
6. Elsőként írtunk le egy beteget, aki csírasejtes *PTEN* és *SDHC* mutációt hordozott.
7. Cowden és Cowden-szerű betegségben előfordulnak *SDHx* génvariánsok, amelyeknek szerepe lehet a fenotípus módosításában. Az *SDHx* variánsokhoz többféle patomechanizmus is társulhat.
8. A MEN1 szindróma szerv-specifikus manifesztációit és a menin fehérje funkcióit összegeztem. A mellékvese daganatok kialakulásában csekély szerepe van a *MEN1* mutációknak.
9. A RET 11-es exonjának TGC634TGG mutáció prognosztikai szerepét tisztáztuk.
10. A RET 10-es exon mutációk esetére mutáció-specifikus diagnosztikai, terápiás és prognosztikai javaslatokat fogalmaztunk meg
11. Gyermekekori pheochromocytómák és paragangliómák esetében is előfordulnak örökletes génhibák, a legrosszabb indulatú daganat *SDHB* mutációk esetén várható.
12. MEN2 szindrómában kialakuló pheochromocytómák esetében a mellékvesekéreg-megtartásával elvégzett daganat-eltávolítás javasolt.
13. A *GR* N363S polimorfizmusa a szénhidrát anyagcserén keresztül szerepet játszik a kétoldali, hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenómák patogenezisében.
14. Új módszert dolgoztunk ki a *GR* BclI polimorfizmus kimutatására.
15. A *CYP21A2* gén vizsgálatára új metodikát dolgoztunk ki.
16. A C4B*Q0 kópiaszámváltozás és a *CYP21A2* gén haplotípusai összefüggés mutatnak az ACTH stimulációra adott mellékvesekéreg hormontermeléssel.
17. A glükokortikoid receptor izoformái expresszálódnak a mellékvesekéreg hormontermelő daganataiban. A GR β expressziót a kortizolt termelő adenómákban volt a legmagasabb.
18. Létrehoztunk egy bélhámsejt-tenyészetet, ami fokozottan expresszálja a GR β izoformáját.
19. Kimutattuk, hogy a GR β a GR α általi géntranszkripciót gátolja, de önálló transzkripciós hatással is rendelkezik.
20. Gyulladásos bélbetegségben a GR β olyan gének expresszióját szabályozza, amelyeknek a sejt-sejt interakcióban van elsődleges szerepe.
21. A mellékvesekéregben a napszaki ritmusért felelős óragéneknek önálló ritmikus expressziója van, így a humán H295R sejtvonal alkalmas a napszaki ingadozással kapcsolatos kísérletek *in vitro* modellezésére.
22. A mikro-RNS expresszió teljes genom szintű meghatározása alapján az eltérések biológiai relevanciáinak megértése csak a különböző platformokból származó adatok integrálásával képzelhető el.
23. Kimutattuk, hogy a hormonálisan inaktív hipofízis daganatokban a WEE1-nek és az őt célzó mikro-RNS-eknek jelentős szerepe van a daganatok patogenezisében. Bebizonyítottuk, hogy a *WEE1* 3' UTR régióját a hipofízis daganatokban fokozott expressziót mutató miR-128a, miR-516a-3p és miR-155 célozzák.
24. A NFPA és ép hipofízis szövetekben az eltérő mértékben expresszálódó mikro-RNS-ek útvonalanalízisével igazoltuk a TGF β jelátviteli út érintettségét ezekben a daganatokban.
25. A CDC25A és CDC25C fokozottan expresszálódnak NFPA daganatokban az ép hipofízis szövetekhez képest. Az őket célzó mikro-RNS-ek expressziója csökkent a daganatokban, ami tumorsuppresszor hatásukra utal.
26. Fluoreszcens festékkel jelölt áramlási citometriás módszert dolgoztunk ki a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejteinek elválasztására.
27. Három különböző sejttípus esetén a sejtciklus progressziója során dinamikus génexpressziót, de stabil mikro-RNS expressziót tapasztaltunk.
28. A sejtciklusfüggő expressziójú RRM2 proliferációs markerként alkalmazható mellékvesekéreg-karcinómában.
29. A mellékvesekéregre specifikus keringő miR-483-5p vérben mérhető koncentrációját nem befolyásolják a dinamikus endokrin tesztek, így tumormarkerként történő alkalmazása ígéretesnek tűnik.
30. A menin sejtmagi hiánya jellemző a MEN1 szindrómához társult mellékpajzsmirigy adenómákban és a sporadikus esetek 27,5%-ában. Ennek leggyakoribb oka a *MEN1* gén mutációja. A *MEN1* 3'UTR-t célzó hsa-miR-24 és hsa-miR-28 expressziója a MEN1-hez társult daganatokban kisebb, mint a sporadikus esetekben.

6. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai közlemények időrendben

A PhD fokozat elnyeréséig született közlemények (2005-ig)

1. Patócs A, Rác K
Pheochromocytoma
HIPPOCRATES (BP) 3:(6) pp. 354-356. (2001)
2. Patócs A, Tóth M, Barta CS, Sasvári-Székely M, Varga I, Szűcs N, Jakab CS, Gláz E, Rác K
Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas
EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 147:(3) pp. 349-355. (2002)
Független idéző: 22 Függő idéző: 4 Összesen: 26 **IF: 2.560**
3. Patócs A, Valkusz Z, Igaz P, Balogh K, Toth M, Varga I, Racz K
Segregation of the V804L mutation and S836S polymorphism of exon 14 of the RET gene in an extended kindred with familial medullary thyroid cancer.
CLINICAL GENETICS 63:(3) pp. 219-223. (2003)
Független idéző: 11 Függő idéző: 3 Összesen: 17 **IF: 2.025**
4. Patócs A, Karadi E, Toth M, Varga I, Szucs N, Balogh K, Majnik J, Glaz E, Racz K
Clinical and biochemical features of sporadic and hereditary pheochromocytomas: an analysis of 41 cases investigated in a single endocrine centre
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER PREVENTION 13:(5) pp. 403-409. (2004)
Független idéző: 15 Függő idéző: 6 Összesen: 21 **IF: 1.785**

PhD fokozat elnyerése (2005) után született közlemények:

5. Balogh K, Patócs A, Majnik J, Racz K, Hunyady L
Genetic screening methods for the detection of mutations responsible for multiple endocrine neoplasia type 1
MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM 83:(1-2) pp. 74-81. (2004)
Független idéző: 29 Függő idéző: 3 Összesen: 32 **IF: 2.502**
6. Balogh K, Patócs A, Majnik J, Varga F, Illyes G, Hunyady L, Racz K
Unusual presentation of multiple endocrine neoplasia type 1 in a young woman with a novel mutation of the MEN1 gene
JOURNAL OF HUMAN GENETICS 49:(7) pp. 380-386. (2004)
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4 **IF: 2.316**
7. Majnik J, Patócs A, Balogh K, Toth M, Racz K
A rapid and simple method for detection of Asn363Ser polymorphism of the human glucocorticoid receptor gene
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 92:(5) pp. 465-468. (2004)
Független idéző: 12 Függő idéző: 9 Összesen: 21 **IF: 2.715**
8. Gergics P, Patócs A, Majnik J, Balogh K, Szappanos A, Toth M, Racz K
Detection of the Bcl I polymorphism of the glucocorticoid receptor gene by single-tube allele-specific polymerase chain reaction
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 100:(4-5) pp. 161-166. (2006)
Független idéző: 12 Függő idéző: 6 Összesen: 18 **IF: 2.825**
9. Majnik J, Patócs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, Mondok A, Borgulya G, Panczel P, Prohaszka Z, Racz K
Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas
JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 91:(7) pp. 2796-2799. (2006)
Független idéző: 17 Függő idéző: 3 Összesen: 20 **IF: 5.799**
10. Patócs A, Klein I, Szilvasi A, Gergics P, Toth M, Valkusz Z, Forizs E, Igaz P, Al-Farhat Y, Tordai A, Váradi A, Racz K, Ésik O
Genotype-phenotype correlations in Hungarian patients with hereditary medullary thyroid cancer
WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT: MIDDLE EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE 118:(13-14) pp. 417-421. (2006)
Független idéző: 9 Függő idéző: 3 Összesen: 12 **IF: 0,804**
11. Balogh K, Racz K, Patócs A, Hunyady L
Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function

- TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM** 17:(9) pp. 357-364. (2006)
Független idéző: 64 Függő idéző: 1 Összesen: 65 **IF: 7.066**
12. Zbuk KM, **Patocs A**, Shealy A, Sylvester H, Miesfeldt S, Eng C
Germline mutations in PTEN and SDHC in a woman with epithelial thyroid cancer and carotid paraganglioma
NATURE CLINICAL PRACTICE ONCOLOGY 4:(10) pp. 608-612. (2007)
Független idéző: 19 Összesen: 19 **IF: 8.217**
13. Balogh K, Hunyady L, **Patocs A**, Gergics P, Valkusz Z, Toth M, Racz K
MEN1 gene mutations in Hungarian patients with multiple endocrine neoplasia type 1
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 67:(5) pp. 727-734. (2007)
Független idéző: 9 Függő idéző: 3 Összesen: 12 **IF: 3.370**
14. **Patocs A**, Gergics P, Balogh K, Toth M, Fazakas F, Liko I, Racz K
Ser80Ile mutation and a concurrent Pro25Leu variant of the VHL gene in an extended Hungarian von Hippel-Lindau family
BMC MEDICAL GENETICS 9: Paper 29. 8 p. (2008)
Független idéző: 7 Függő idéző: 1 Összesen: 8 **IF: 2.762**
15. Milos IN, Frank-Raue K, Wohllk N, Maia AL, Pusiol E, **Patocs A**, Robledo M, Biarnes J, Barontini M, Links TP, de Groot JW, Dvorakova S, Peczkowska M, Rybicki LA, Sullivan M, Raue F, Zosin I, Eng C, Neumann HPH
Age-related neoplastic risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germ line RET Cys634Trp (TGC>TGG) mutation
ENDOCRINE-RELATED CANCER 15:(4) pp. 1035-1041. (2008)
Független idéző: 14 Függő idéző: 13 Összesen: 27 **IF: 5.236**
16. Ni Y, Zbuk KM, Sadler T, **Patocs A**, Lobo G, Edelman E, Platzer P, Orloff MS, Waite KA, Eng C
Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes
AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 83:(2) pp. 261-268. (2008)
Független idéző: 90 Függő idéző: 30 Összesen: 120 **IF: 10.153**
17. **Patocs A**, Balogh K, Racz K
Adrenal tumors in MEN1 syndrome and the role of menin in adrenal tumorigenesis
ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY 668: pp. 97-103. (2009) **IF: 2.020**
18. Gergics P, **Patocs A**, Tóth M, Igaz P, Szücs N, Liko I, Fazakas F, Szabó I, Kovács B, Gláz E, Rác K
Germline VHL gene mutations in Hungarian families with von Hippel-Lindau disease and patients with apparently sporadic unilateral pheochromocytomas
EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 161:(3) pp. 495-502. (2009)
Független idéző: 7 Függő idéző: 5 Összesen: 12 **IF: 3.539**
19. Balogh K, **Patocs A**, Hunyady L, Rác K
Menin dynamics and functional insight: Take your partners.
MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY 326:(1-2) pp. 80-84. (2010)
Független idéző: 26 Összesen: 26 **IF: 4.119**
20. Boyle B; Butz H; Liko I; Zalatnai A; Szabó PM; Tóth M; Feldman K; Lendvai N; Bertalan R; Szücs N; Igaz P; Rác K; **Patocs A**
Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas
STEROIDS 75: (10) pp. 695-700 (2010)
Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10 **IF: 3.106**
21. Butz H; Liko I; Czirják S; Igaz P; Korbonits M; Bálint K; Rác K; **Patocs A**
Downregulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNAs in human sporadic pituitary adenomas
J CLIN ENDOCRINOL METAB 95:(10) pp. E181-E191. (2010)
Független idéző: 44 Függő idéző: 12 Összesen: 56 **IF: 6.495**
22. Frank-Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, Schweizer H, Winter A, Milos I, Toledo SP, Toledo RA, Tavares MR, Alevizaki M, Mian C, Siggelkow H, Hüfner M, Wohllk N, Opocher G, Dvořáková S, Bendlova B, Czetwertynska M, Skasko E, Barontini M, Sanso G, Vorländer C, Maia AL, **Patocs A**, Links TP, de Groot JW, Kerstens MN, Valk GD, Miehle K, Musholt TJ, Biarnes J, Damjanovic S, Muresan M, Wüster C, Fassnacht M, Peczkowska M, Fauth C, Golcher H, Walter MA, Pichl J, Raue F, Eng C, Neumann HP; International RET Exon 10 Consortium.
Risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10.
HUMAN MUTATION 32:(1) pp. 51-58. (2011)
Független idéző: 36 Függő idéző: 24 Összesen: 60 **IF: 5.686**
23. Butz H; Liko I; Czirják S; Igaz P; Korbonits M; Rác K; **Patocs A**:
MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFβ pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas
PITUITARY 14:(2) pp. 112-124. (2011)
Független idéző: 40 Függő idéző: 11 Összesen: 51 **IF: 1.830**

24. Lendvai N, Tóth M, Valkusz Z, Bekő G, Szűcs N, Csajbók É, Igaz P, Kriszt B, Kovács B, Rác K, **Patócs A**
Over-representation of the G12S polymorphism of the SDHD gene in patients with MEN2A syndrome
CLINICS 67:(S1) pp. 85-89. (2012)
Független idéző: 2 Összesen: 2 IF: 0
25. Banlaki Z, Raizer G, Acs B, Majnik J, Doleschall M, Szilagyi A, Racz K, Fust G, **Patocs A**
ACTH-induced cortisol release is related to the copy number of the C4B gene encoding the fourth component of complement in patients with non-functional adrenal incidentaloma Patients with Non-functional Adrenal Incidentaloma.
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 76:(4) pp. 478-484. (2012)
Független idéző: 1 Függő idéző: 3 Összesen: 4 IF: 3,396
26. Butz H, Rác K, Hunyady L, **Patócs A**
Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery
TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES 33:(7) pp. 382-393. (2012)
Független idéző: 59 Összesen: 59 IF: 9,25
27. Szabó PM, Butz H, Igaz P, Rác K, Hunyady L, **Patócs A**
Minireview: MiRomics in Endocrinology: A Novel Approach for Modeling Endocrine Diseases.
MOLECULAR ENDOCRINOLOGY 27:(4) pp. 573-585. (2013)
Független idéző: 5 Függő idéző: 4 Összesen: 9 IF: 4,201
28. Castinetti F, Qi XP, Walz MK, Maia AL, Sanso G, Peczkowska M, Hasse-Lazar K, Links TP, Dvorakova S, Toledo RA, Mian C, Bugalho MJ, Wohllk N, Kollyukh O, Canu L, Loli P, Bergmann SR, Costa JB, Makay O, **Patocs A**, Pfeifer M, Shah NS, Cuny T, Brauckhoff M, Bausch B, von Dobschuetz E, Letizia C, Barczynski M, Alevizaki MK, Czetwertynska M, Ugurlu MU, Valk G, Plukker JT, Sartorato P, Siqueira DR, Barontini M, Szperl M, Jarzab B, Verbeek HH, Zelinka T, Vlcek P, Toledo SP, Coutinho FL, Mannelli M, Recasens M, Demarquet L, Petramala L, Yaremchuk S, Zabolotnyi D, Schiavi F, Opocher G, Racz K, Januszewicz A, Weryha G, Henry JF, Brue T, Conte-Devolx B, Eng C,
Outcomes of adrenal-sparing surgery or total adrenalectomy in pheochromocytoma associated with multiple endocrine neoplasia type 2: an international retrospective population-based study.
LANCET ONCOLOGY 15:(6) pp. 648-655. (2014)
Független idéző: 12 Függő idéző: 7 Összesen: 19 IF: 24,690
29. Lendvai N, Pawlosky R, Bullova P, Eisenhofer G, **Patocs A**, Veech RL, Pacak K
Succinate-to-Fumarate Ratio as a New Metabolic Marker to Detect the Presence of SDHB/D-related Paraganglioma: Initial Experimental and Ex Vivo Findings.
ENDOCRINOLOGY 155:(1) pp. 27-32. (2014)
Független idéző: 12 Függő idéző: 9 Összesen: 21 IF: 4.503
30. Doleschall M, Szabo JA, Pazmandi J, Szilagyi A, Koncz K, Farkas H, Toth M, Igaz P, Glaz E, Prohaszka Z, Korbonits M, Racz K, Fust G, **Patocs A**
Common Genetic Variants of the Human Steroid 21-Hydroxylase Gene (CYP21A2) Are Related to Differences in Circulating Hormone Levels.
PLOS ONE 9:(9) p. e107244. (2014)
Független idéző: 4 Összesen: 4 IF: 3,234
31. Bausch B, Wellner U, Bausch D, Schiavi F, Barontini M, Sanso G, Walz MK, Peczkowska M, Weryha G, Dall'igna P, Cecchetto G, Bisogno G, Moeller L, Bockenhauer D, **Patocs A**, Racz K, Zabolotnyi D, Yaremchuk S, Dzivite-Krisane I, Castinetti F, Taieb D, Malinoc A, von Dobschuetz E, Roessler J, Schmid KW, Opocher G, Eng C, Neumann HP
Long term prognosis of patients with pediatric pheochromocytoma.
ENDOCRINE-RELATED CANCER 21:(1) pp. 17-25. (2014)
Független idéző: 14 Függő idéző: 2 Összesen: 16 IF: 4,805
32. Igaz I, Nyíró G, Nagy Z, Butz H, Nagy Z, Perge P, Sahin P, Tóth M, Rác K, Igaz P, **Patócs A**
Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin
INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 2015: Paper 89230. 6 p. (2015)
Független idéző: 2 Összesen: 2 IF: 2,376
33. Grolmusz VK, Toth EA, Baghy K, Liko I, Darvasi O, Kovalszky I, Matko J, Racz K, **Patocs A**
Fluorescence activated cell sorting followed by small RNA sequencing reveals stable microRNA expression during cell cycle progression.
BMC GENOMICS 17:(1) Paper 412. 16 p. (2016)
Független idéző: 1 Összesen: 1 IF: 3,729
34. Grolmusz VK, Karázi K, Micsik T, Tóth EA, Mészáros K, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rác K, Igaz P, **Patócs A**
Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer
AMERICAN J CANCER RESEARCH 6(9) pp. 2041-2053. (2016)
IF: 3,425*
35. **Patocs A**, Lendvai NK, Butz H, Liko I, Sapi Z, Szucs N, Toth G, Grolmusz VK, Igaz P, Toth M, Racz K

- Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with pheochromocytoma / Paraganglioma Syndrome.
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 22:673-679 (2016) **IF: 1,940***
 Független idéző: 1 Összesen: 1
36. Butz H, Kinga N, Racz K, **Patocs A**
 Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders.
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 39:(1) pp. 1-10. (2016) **IF: 1.994***
 Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3
37. Tretter L, **Patocs A**, Chinopoulos C
 Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis.
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS 1857:(8) pp. 1086-1011 (2016.)
 Független idéző: 6 Összesen: 6
38. Nagy Z, Marta A, Butz H, Liko I, Racz K, **Patocs A**
 Modulation of the circadian clock by glucocorticoid receptor isoforms in the H295R cell line.
STEROIDS 116: pp. 20-27. (2016) **IF: 2,513***
39. Nagy Z, Acs B, Butz H, Feldman K, Marta A, Szabo PM, Baghy K, Pazmany T, Racz K, Liko I, **Patocs A**
[Overexpression of GRβ in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease.](#)
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 155:(Pt A) pp. 76-84. (2016)
 Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2 **IF: 3,985***
40. Bausch B, Schiavi F, Ni Y, Welander J, **Patocs A**, Ngeow J, Wellner U, Malinoc A, Taschin E, Barbon G, Lanza V, Soderkvist P, Stenman A, Larsson C, Svahn F, Chen JL, Marquard J, Fraenkel M, Walter MA, Peczkowska M, Prejbisz A, Jarzab B, Hasse-Lazar K, Petersenn S, Moeller LC, Meyer A, Reisch N, Trupka A, Brase C, Galiano M, Preuss SF, Kwok P, Lendvai N, Berisha G, Makay O, Boedeker CC, Weryha G, Racz K, Januszewicz A, Walz MK, Gimm O, Opocher G, Eng C, Neumann HP
 Clinical Characterization of the Pheochromocytoma and Paraganglioma Susceptibility Genes SDHA, TMEM127, MAX, and SDHAF2 for Gene-Informed Prevention.
JAMA ONCOLOGY 3: Paper 2017.0223. (2017)
41. Butz H, Nemeth K, Czenke D, Liko I, Czirjak S, Zivkovic V, Baghy K, Korbonits M, Kovalszky I, Igaz P, Racz K, **Patocs A**
 Systematic Investigation of Expression of G2/M Transition Genes Reveals CDC25 Alteration in Nonfunctioning Pituitary Adenomas.
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 23:(3) pp. 633-641. (2017) **IF: 1,940****
42. Grolmusz VK, Borka K, Kövesdi A, Németh K, Balogh K, Dékány Cs, Kiss A, Szentpéteri A, Sárman B, Somogyi A, Csajbók É, Valkusz Z, Tóth M, Igaz P, Rácz K, **Patócs A**
 MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN-1 syndrome associated primary hyperparathyroidism
VIRCHOWS ARCHIV 470: Paper 017-2158-3. 11 p. (2017) **IF: 2.627****

6.2. Magyar nyelvű folyóiratcikkek:

- Balogh K, Hunyady L, **Patocs A**, Valkusz Z, Bertalan R, Gergics P, Majnik J, Toke J, Toth M, Szucs N, Glaz E, Futo L, Horanyi J, Racz K, Tulassay Z
 Az 1-es típusú multiplex endokrin neoplasia klinikai tünetei, diagnózisa és kezelése. A genetikai vizsgálatok hazai tapasztalatai
ORVOSI HETILAP 146:(43) pp. 2191-2197. (2005)
 Függő idéző: 2 Összesen: 2
- Bertalan R, Patócs A, Balogh K, Tóke J, Boyle B, Tóth M, Kiss R, Varga I, Gláz E, Rácz K, Tulassay Zs
 A pheochromocytoma örökletes formáinak klinikai és genetikai szűrése
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 59:(2) pp. 103-108. (2006)
- Patócs A**, Balogh K, Varga I, Tóth M, Békési G, Gláz E, Rácz K, Tulassay ZS
 A PTEN tumorszuppresszor gén szerepe endokrin és nem endokrin daganatokban
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(5) pp. 413-417. (2007)
- Sallai Á; Igaz P; **Patócs A**; Gergics P; Rácz K; Fekete G
 Profilaktikus thyreoidectomia gyermekkorban
GYERMEKGYÓGYÁSZAT 59, 109-113 (2008)
- Butz H, Liko I, Boyle B, Lendvai N, Igaz P, Czirjak S, Korbonits M, Rácz K, **Patócs A**
 A mikro-RNS-kutatás módszerei és alkalmazásuk hypophysis daganatokban
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 62:(5) pp. 355-362. (2009)
- Gergics P, Toke J, Szilágyi A, Szappanos A, Kender Z, Barta G, Tóth M, Igaz P, Rácz K, **Patócs A**
 A nagy géndeletiok kimutatásának módszerei és alkalmazásuk egyes örökletes betegségekben
ORVOSI HETILAP 150:(50) pp. 2258-2264. (2009)
 Független idéző: 2 Összesen: 2

7. Lendvai Nikolett, Szabó Ildikó, Butz Henriett, Bekő Gabriella, Horányi János, Tarjányi Mária, Alföldi Sándor, Szabó István, Rácz Károly, **Patócs A**
SDHD génmutációhoz társult extraadrenális phaeochromocytoma [Extra-adrenal pheochromocytoma associated to SDHD gene mutation]
ORVOSI HETILAP 150:(14) pp. 645-649. (2009)
Független idéző: 1 Összesen: 1
8. **Patócs A**, Vásárhelyi Barna, Butz Henriett
Mikro-RNS-ek a laboratóriumi diagnosztikában
ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 19:(9) pp. 17-24. (2012)
9. Tőke Judit, Balog Beatrice, Csőregh Éva, Jakab Zsuzsa, Dabasi Gabriella, **Patócs Attila**, Rácz Károly, Tóth Miklós
Malignus phaeochromocytoma esete - 47 éve tartó kórtörténet
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 67:(6) pp. 412-417. (2014)
10. Tőke J, Czirják G, Tóth M, Rácz K, **Patócs A**
Biokémiai markerek jelentősége a neuroendokrin daganatok felismerésében és a betegek követésében
ORVOSI HETILAP 155:(45) pp. 1775-1782. (2014)
Függő idéző: 1 Összesen: 1
11. Balog B, Tőke J, Róna K, Szücs N, Igaz P, Pusztai P, Sárman B, Gláz E, Kiss R, **Patócs A**, Racz K, Toth M
A laboratóriumi diagnosztika eredményei az elmúlt 20 évben kórismézett 155 phaeochromocytoma/paraganglioma szindrómás beteg adatainak elemzése alapján.
ORVOSI HETILAP 156:(16) pp. 626-635. (2015)
12. **Patócs A**, Liko I, Butz H, Baghy K, Racz K
Új módszertani lehetőségek és ezek alkalmazása a hormonális rendszer daganatainak genetikai kivizsgálásában
ORVOSI HETILAP 156:(51) pp. 2063-2069. (2015)
13. **Patócs A**, Igaz P, Tőke J, Lendvai N, Sarkadi B, Grolmusz V, Butz H, Tóth G, Németh K, Gláz E, Kiss R, Pusztai P, Sárman B, Reismann P, Szücs N, Tóth M, Rácz K
Örökletes phaeochromocytomák és paragangliomák molekuláris genetikai vizsgálatával szerzett hazai tapasztalatok
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 69: pp. 83-92. (2016)
14. Tóth Géza, **Patócs Attila**, Tóth Miklós
Ikerpárban előforduló örökletes phaeochromocytoma: [Hereditary phaeochromocytoma in twins]
ORVOSI HETILAP 157:(33) pp. 1326-1330. (2016) **IF: 0.291***

6.3. Az értekezéshez kapcsolódó szerkesztőségi hozzászólások:

1. Igaz P, **Patócs A**, Rácz K:
Uncommon MEN2A phenotype in a patient with a RET protooncogene exon 10, codon 611 mutation. [Letter to the Editor]
CLIN ENDOCRINOL 71, 304-305 (2009)
Függő idéző: 1 Összesen: 1

6.4. Az értekezéshez kapcsolódó könyvfejezetek:

1. Balogh K, **Patocs A** (szerk.)
SuperMEN1: Pituitary, Parathyroid and Pancreas
New York: Landes Bioscience; Springer Science+Business Media, 136 p. (2009).
(Advances in experimental medicine and biology; 668.) ISBN:[978-1-4419-1662-4](#))
2. **Patócs Attila**
Endokrin rendszer laboratóriumi vizsgálata
In: Bekő Gabriella, Patócs Attila, Prohászka Zoltán, Sárváry Enikő, Szabó Antal, Vásárhelyi B, Szabó Antal (szerk.)
Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek: Egyetemi jegyzet. 264 p. Budapest: Semmelweis Kiadó, 2010. pp. 177-193. ISBN:9789639879751) (2010)
3. **Patócs Attila**
Molekuláris biológiai vizsgálatok
In: Bekő Gabriella, Patócs Attila, Prohászka Zoltán, Sárváry Enikő, Szabó Antal, Vásárhelyi B, Szabó Antal (szerk.)
Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek: Egyetemi jegyzet. 264 p. Budapest: Semmelweis Kiadó, 2010. pp. 195-204. ISBN:9789639879751) (2010)
4. **Patócs Attila:**
Multiplex endokrin neoplasiák és egyéb örökletes endokrin tumor szindrómák In: Leövey A, Nagy VE, Paragh G, Rácz K (szerk.) Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve

Budapest: Medicina Könyvkiadó, pp. 447-464. (ISBN:978-963-226-277-2 (2011.))

5. Henriett Butz, Károly Rác, **Attila Patócs**

Epigenetic and Posttranscriptional Alterations of Tumor Suppressor Genes in Sporadic Pituitary Adenomas

In: Yue Cheng (szerk.)

TUMOR SUPPRESSOR GENES. 331 p.

Rijeka: InTech Open Access Publisher, pp. 221-246. ISBN:978-953-307-879-3) (2012)

6. **Patócs Attila:**

A fej-nyak régiót érintő, örökletes betegségek

In: Tulassay Zs, Békési G, Rác K (szerk.) **A belgyógyászat alapjai fogorvosok számára**. 544 p. Budapest: Medicina., pp. 391-400. ISBN:[978 963 226 467 7](#)) (2014)

7 Butz H, **Patócs A.**

Technical Aspects Related to the Analysis of Circulating microRNAs.

EXS. 2015;106:55-71. doi: 10.1007/978-3-0348-0955-9_3. (2015)

6.5. Az értékezésben nem tárgyalt további nemzetközi és hazai közlemények időrendben

1. Racz K, Toth M, **Patocs A**, Glaz E
Incidentally discovered adrenal masses.
ENDOKRYNOLOGIA POLSKA 51:(1) pp. 85-88. (2000)
2. Szucs N, Varga I, Jakab C, **Patocs A**, Glaz E, Toth M, Kiss R, Racz K
Leptin inhibits cortisol and corticosterone secretion in pathologic human adrenocortical cells
PITUITARY 4:(1-2) pp. 71-77. (2001)
Független idéző: 13 Összesen: 13
3. Igaz P, Pap E, **Patócs A**, Falus A, Tulassay Z, Rác K
Genomics of steroid hormones: in silico analysis of nucleotide sequence variants (polymorphisms) of the enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of steroid hormones.
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 82:(4-5) pp. 359-367. (2002)
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4 IF: 2.637
4. Igaz P, Patocs A, Racz K, Klein I, Varadi A, Esik O
Occurrence of pheochromocytoma in a MEN2A family with codon 609 mutation of the RET proto-oncogene
JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 87:(6) p. 2994. (2002)
Független idéző: 18 Függő idéző: 1 Összesen: 19 IF: 5.199
5. Igaz P, **Patocs A**, Racz K
Novel sequence variants of the genes associated with the multiple endocrine neoplasia syndromes 1 and 2. analysis by an "in silico approach."
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 25:(7) pp. 609-613. (2002) IF: 1.476
6. Speer G, Tóth M, Niller HH, Salamon D, Takács I, Miheller P, **Patócs A**, Nagy Z, Bajnok E, Nyiri P, Lakatos P
Calcium metabolism and endocrine functions in a family with familial hypocalciuric hypercalcemia
EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 111:(8) pp. 486-490. (2003)
Független idéző: 7 Összesen: 7 IF: 1.956
7. Tóth M, Speer G, Patócs A, Salamon D, Lakatos P, Rác K, Tulassay ZS
Familiáris hypocalciuriás hypocalcaemia
ORVOSI HETILAP 144:(41) pp. 2029-2031. (2003)
8. Szucs N, Varga I, **Patocs A**, Toth M, Glaz E, Racz K
Secretion of 6beta-hydroxycortisol by normal human adrenals and adrenocortical adenomas
STEROIDS 68:(5) pp. 477-482. (2003)
Független idéző: 3 Összesen: 3 IF: 2.444
9. Szucs N, Varga I, **Patocs A**, Toth M, Jakab C, Glaz E, Racz K
Plasma 6beta-hydroxycortisol measurements for assessing altered hepatic drug metabolizing enzyme activity
ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 90:(3) pp. 217-223. (2003)
Független idéző: 2 Összesen: 2
10. Varga I, Jakab C, Szucs N, **Patocs A**, Toth M, Kiss R, Glaz E, Racz K

- Plasma and salivary 6beta-hydroxycortisol measurements for assessing adrenocortical activity in patients with adrenocortical adenomas
HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 35:(7) pp. 421-426. (2003)
 Független idéző: 2 Összesen: 2 IF: 1.669
11. Csákváry V, Tóth M, Patócs A, Varga I, Oroszlán G, Rácz K
 A kalciumérzékelő receptor génjének de novo heterozigóta R551K pontmutációja és A986S polimorfizmusa újszülöttkori súlyos primer hyperparathyreosisban
CA ÉS CSONT 7:(4) pp. 141-145. (2004)
 12. Liko I, Igaz P, **Patocs A**, Toth S, Pazmany T, Toth M, Racz K
 Sequence variants of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor gene and their functional consequences on the three-dimensional protein structure
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 11:(24) pp. 3229-3237. (2004)
 Független idéző: 1 Függő idéző: 3 Összesen: 4 IF: 4.382
 13. Majnik J, Szucs N, **Patocs A**, Toth M, Balogh K, Varga I, Glaz E, Racz K
 Effect of single doses of dexamethasone and adrenocorticotrop hormone on serum bone markers in healthy subjects and in patients with adrenal incidentalomas and Cushing's syndrome
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 27:(8) pp. 747-753. (2004)
 Független idéző: 2 Függő idéző: 3 Összesen: 5 IF: 1.525
 14. **Patocs A**, Liko I, Varga I, Gergics P, Boros A, Futo L, Kun I, Bertalan R, Toth S, Pazmany T, Toth M, Szucs N, Horanyi J, Glaz E, Racz K
 Novel mutation of the CYP17 gene in two unrelated patients with combined 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency: demonstration of absent enzyme activity by expressing
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 97:(3) pp. 257-265. (2005)
 Független idéző: 20 Összesen: 20 IF: 2.866
 15. Sweet K, Willis J, Zhou XP, Gallione C, Sawada T, Alhopuro P, Khoo SK, **Patocs A**, Martin C, Bridgeman S, Heinz J, Pilarski R, Lehtonen R, Prior TW, Frebourg T, Teh BT, Marchuk DA, Aaltonen LA, Eng C
 Molecular classification of patients with unexplained hamartomatous and hyperplastic polyposis
JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION 294:(19) pp. 2465-2473. (2005)
 Független idéző: 143 Függő idéző: 26 Összesen: 169 IF: 23.494
 16. Halasz Z, Toke J, **Patocs A**, Bertalan R, Tombol Z, Sallai A, Hosszu E, Muzsnai A, Kovacs L, Solyom J, Fekete G, Racz K
 High prevalence of PROP1 gene mutations in Hungarian patients with childhood-onset combined anterior pituitary hormone deficiency.
ENDOCRINE 30:(3) pp. 255-260. (2006)
 Független idéző: 13 Függő idéző: 2 Összesen: 15 IF: 1.805
 17. Weber F, Shen L, Fukino K, **Patocs A**, Mutter GL, Caldes T, Eng C
 Total-genome analysis of BRCA1/2-related invasive carcinomas of the breast identifies tumor stroma as potential landscaper for neoplastic initiation
AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 78:(6) pp. 961-972. (2006)
 Független idéző: 56 Függő idéző: 8 Összesen: 64 IF: 12.629
 18. Fukino K, Shen L, **Patocs A**, Mutter GL, Eng C
 Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma
JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION 297:(19) pp. 2103-2111. (2007)
 Független idéző: 86 Függő idéző: 5 Összesen: 91 IF: 25.547
 19. **Patocs A**, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C
 Breast-Cancer Stromal Cells with TP53 Mutations and Nodal Metastases
NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE 357:(25) pp. 2543-2551. (2007)
 Független idéző: 201 Függő idéző: 6 Összesen: 207 IF: 52.589
 20. Mercado M, Borges F, Bouterfa H, Chang T -C, Chervin A, Farrall A J, **Patocs A**, Petersenn S, Podoba J, Safari M, Wardlaw J, on behalf of the SMS995B2401 Study Group
 A prospective, multicentre study to investigate the efficacy, safety and tolerability of octreotide LAR? (long-acting repeatable octreotide) in the primary therapy of patients with acromegaly

- CLINICAL ENDOCRINOLOGY** 66:(6) pp. 859-868. (2007)
Független idéző: 116 Függő idéző: 21 Összesen: 137 IF: 3.370
21. Toke J, Czirjak G, **Patocs A**, Enyedi B, Gergics P, Csakvary V, Enyedi P, Toth M
Neonatal severe hyperparathyroidism associated with a novel de novo heterozygous R551K inactivating mutation and a heterozygous A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 67:(3) pp. 385-392. (2007)
Független idéző: 18 Függő idéző: 1 Összesen: 19 IF: 3.370
 22. Tóth M, Tőke J, Horányi J, Stenczer B, **Patócs A**, Balogh K, Jakab ZS, Szűcs N, Gergics P, Varga I, Rác K, Tulassay ZS
A sporadikus és familiáris primer hyperparathyreosis klinikai és laboratóriumi jellemzői
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(2) pp. 154-159. (2007)
 23. Tőke J, Tóth M, **Patócs A**, Bertalan R, Gergics P, Stenczer B, Speer G, Lakatos P, Rác K, Tulassay Zs
A kalcium-szenzor gén mutációvizsgálatának hazai tapasztalatai
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(5) pp. 451-454. (2007)
 24. Weber F, Xu Y, Zhang L, **Patocs A**, Shen L, Platzer P, Eng C
Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma
JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION 297:(2) pp. 187-195. (2007)
Független idéző: 59 Függő idéző: 9 Összesen: 68 IF: 25.547
 25. Bekő G, Krkos K, Rác K, **Patócs A**, Tulassay Zs
A szérum inzulinszerű növekedési faktor-I (IGF-I) referenciatartományának vizsgálata
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 61:(5) pp. 400-405. (2008)
 26. Bertalan R, **Patocs A**, Vasarhelyi B, Treszl A, Varga I, Szabo E, Tamas J, Toke J, Boyle B, Nobilis A, Rigo J Jr, Rac K
Association between birth weight in preterm neonates and the BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene.
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 111:(1-2) pp. 91-94. (2008)
Független idéző: 11 Összesen: 11 IF: 2.827
 27. Boyle B, Korányi K, **Patocs A**, Liko I, Szappanos A, Bertalan R, Rac K, Balazs C
Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in Graves ophthalmopathy
BRITISH JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY 92:(1) pp. 131-134. (2008)
Független idéző: 12 Függő idéző: 4 Összesen: 16 IF: 2.859
 28. Fütő J, Tőke J, **Patócs A**, Szappanos Á, Varga I, Gláz E, Tulassay ZS, Rác K, Tóth M
Skeletal differences in bone mineral area and content before and after cure of endogenous Cushing's syndrome
OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL 19:(7) pp. 941-949. (2008)
Független idéző: 23 Függő idéző: 4 Összesen: 27 IF: 4.290
 29. Halász Z, Bertalan R, Toke J, **Patócs A**, Tóth M, Fekete G, Gláz E, Rác K
Laterality disturbance and hypopituitarism. A case report of co-existing situs inversus totalis and combined pituitary hormone deficiency
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 31:(1) pp. 74-78. (2008)
Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5 IF: 1.888
 30. Bertalan R, **Patocs A**, Boyle B, Rigo J Jr, Rac K
The protective effect of the ER22/23EK polymorphism against an excessive weight gain during pregnancy
GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY 25:(6) pp. 379-382. (2009)
Független idéző: 4 Összesen: 4 IF: 1.360
 31. Bertalan R, **Patocs A**, Nagy B, Derzsy Z, Gullai N, Szappanos A, Rigo J Jr, Rac K
Overrepresentation of BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene in pregnant women with HELLP syndrome.
CLINICA CHIMICA ACTA 405:(1-2) pp. 148-152. (2009)
Független idéző: 5 Függő idéző: 2 Összesen: 7 IF: 2.535
 32. Lőcsei Z, Rác K, **Patocs A**, Kovacs GL, Toldy E

- Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration
CLINICA CHIMICA ACTA 402:(1-2) pp. 203-205. (2009)
 Független idéző: 13 Függő idéző: 1 Összesen: 14 IF: 2.535
33. Mondok Á, Tóth M, **Patócs A**, Szücs N, Igaz P, Pusztai P, Czirják S, Bekő G, Gláz E, Rác K, Tulassay ZS
 A szomatosztatinanalóg kezelés eredményei acromegáliában
ORVOSI HETILAP 150:(31) pp. 1457-1462. (2009)
34. Mondok A, Varga I, Glaz E, Szucs N, Toth M, **Patocs A**, Beko G, Racz K
 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in acromegalic patients with normal or impaired carbohydrate metabolism
STEROIDS 74:(9) pp. 725-729. (2009)
 Független idéző: 2 Összesen: 2 IF: 2.905
35. Szabó PM, Wiener Z, Tömböl Z, Kovács A, Pócsa P, Horányi J, Kulka J, Riesz P, Tóth M, **Patócs A**, Gaillard RC, Falus A, Rác K, Igaz P
 Differences in the expression of histamine-related genes and proteins in normal human adrenal cortex and adrenocortical tumors.
VIRCHOWS ARCHIV 455:(2) pp. 133-142. (2009)
 Független idéző: 8 Összesen: 8 IF: 2.305
36. Szappanos A, **Patócs A**, Tőke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, Borgulya G, Varga I, Likó I, Rác K, Tóth M
 BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 71:(5) pp. 636-643. (2009)
 Független idéző: 23 Függő idéző: 4 Összesen: 27 IF: 3.201
37. Tömböl Z, Szabó P, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, **Patócs A**, Likó I, Gaillard R, Falus A, Rác K, Igaz P
 Integrative molecular-bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue specific target prediction and pathway analysis.
ENDOCRINE-RELATED CANCER 16:(3) pp. 895-906. (2009)
 Független idéző: 76 Függő idéző: 21 Összesen: 97 IF: 4.282
38. Beko G, Varga I, Glaz E, Sereg M, Feldman K, Toth M, Racz K, **Patocs A**
 Cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods
CLINICA CHIMICA ACTA 411:(5-6) pp. 364-367. (2010)
 Független idéző: 26 Függő idéző: 1 Összesen: 27 IF: 2.389
39. Halászlaki C, Horváth H, Kiss L, Takács I, Speer G, Nagy Z, Winternitz T, Dabasi G, Zalatnai A, **Patócs A**, Lakatos P
 Verner-Morrison szindróma egy esete [Verner-Morrison syndrome: a case study]
ORVOSI HETILAP 151:(27) pp. 1111-1114. (2010)
 Független idéző: 1 Összesen: 1
40. Pregon I, Herszényi L, Juhász M, Miheller P, **Patócs A**, Rác K, Tulassay Zs
 A szérum kromogranin A szint változásának dinamikája protonpumpa-gátlók hatására
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 63:(4) pp. 281-287. (2010)
41. Rita Bertalan, Ágnes Sallai, János Sólyom, Gábor Lotz, István Szabó, Balázs Kovács, Éva Szabó, **Attila Patócs**, Károly Rác
 Hyperthyroidism caused by germline activating mutation of the thyrotropin receptor gene: difficulties in diagnosis and therapy
THYROID 20:(3) pp. 327-332. (2010)
 Független idéző: 7 Összesen: 7 IF: 4.327
42. Szabó PM, Tamási V, Molnár V, Andrásfalvy M, Tömböl Z, Farkas R, Kövesdi K, **Patócs A**, Tóth M, Szalai C, Falus A, Rác K, Igaz P
 Meta-analysis of adrenocortical tumor genomics data: novel pathogenic pathways revealed
ONCOGENE 29:(21) pp. 3163-3172. (2010)
 Független idéző: 37 Függő idéző: 10 Összesen: 47 IF: 7.414

43. Szappanos A, Tőke J, Lippai D, **Patócs A**, Igaz P, Szűcs N, Fütő L, Gláz E, Rác K, Tóth M
Bone turnover in patients with endogenous cushing's syndrome before and after successful treatment.
OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL 21:(4) pp. 637-645. (2010)
Független idéző: 16 Függő idéző: 3 Összesen: 19 IF: 4.859
44. Tömböl Z, Éder K, Kovács A, Szabó P M, Kulka J, Likó I, Zalatnai A, Rác G, Tóth M, **Patócs A**, Falus A, Rác K, Igaz P
MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas
MODERN PATHOLOGY 23:(12) pp. 1583-1595. (2010)
Független idéző: 31 Függő idéző: 5 Összesen: 36 IF: 4.176
45. Pregun I, Herszenyi L, Juhasz M, Miheller P, Hritz I, **Patocs A**, Rac K, Tulassay Z
Effect of Proton-Pump Inhibitor Therapy on Serum Chromogranin A Level.
DIGESTION 84:(1) pp. 22-28. (2011)
Független idéző: 19 Függő idéző: 1 Összesen: 20 IF: 2.046
46. Sereg M, Toke J, **Patocs A**, Varga I, Igaz P, Szucs N, Horanyi J, Pusztai P, Czirjak S, Glaz E, Rac K, Toth M
Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin measurements in patients with overt and subclinical Cushing's syndrome
STEROIDS 76:(1-2) pp. 38-42. (2011)
Független idéző: 23 Függő idéző: 2 Összesen: 25 IF: 2.829
47. Szappanos A, **Patócs A**, Gergics P, Bertalan R, Kerti A, Acs B, Feldmann K, Rác K, Tóth M
The 83,557insA variant of the gene coding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme associates with serum osteocalcin in patients with endogenous Cushing's syndrome
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 123:(1-2) pp. 79-84. (2011)
Független idéző: 3 Függő idéző: 4 Összesen: 7 IF: 3.053
48. Halaszlaki C, Takacs I, **Patocs A**, Lakatos P
Új genetikai mutáció a Carney-komplex-betegség magyarországi esetének hátterében. [Novel mutation in a patient with Carney complex.]
ORVOSI HETILAP 152:(20) pp. 802-804. (2011)
Független idéző: 3 Összesen: 3
49. Feldman K, Szappanos A, Butz H, Grolmusz V, Majnik J, Likó I, Kriszt B, Lakatos P, Tóth M, Rác K, **Patócs A**
The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the HSD11B1 gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women.
STEROIDS 77:(13) pp. 1345-1351. (2012)
Független idéző: 9 Függő idéző: 3 Összesen: 12 IF: 2.803
50. Szabo PM, Pinter M, Szabo DR, Zsippai A, **Patocs A**, Falus A, Rac K, Igaz P
Integrative analysis of neuroblastoma and pheochromocytoma genomics data.
BMC MEDICAL GENOMICS 5:(1) Paper 48. 19 p. (2012)
Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5 IF: 3.466
51. Trivellin G, Butz H, Delhove J, Igreja S, Chahal HS, Zivkovic V, McKay T, **Patócs A**, Grossman AB, Korbonits M
MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and in vitro inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP).
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 303:(6) pp. E708-E719. (2012)
Független idéző: 20 Függő idéző: 7 Összesen: 27 IF: 4.514
52. Zsippai A, Szabo DR, Tombol Z, Szabo PM, Eder K, Pallinger E, Gaillard RC, **Patocs A**, Toth S, Falus A, Rac K, Igaz P
Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCI-H295R: a microarray study.
PHARMACOGENOMICS 13:(12) pp. 1351-1361. (2012)
Független idéző: 7 Függő idéző: 2 Összesen: 9 IF: 3.857
53. Balogh P, Szabo A, Katz S, Liko I, **Patocs A**, L Kiss A
Estrogen Receptor Alpha Is Expressed in Mesenteric Mesothelial Cells and Is Internalized in Caveolae upon Freund's Adjuvant Treatment.

- PLOS ONE** 8:(11) Paper e79508. 10 p. (2013)
Független idéző: 3 Függő idéző: 4 Összesen: 7 IF: 3.534
54. Banlaki Z, Szabo JA, Szilagyi A, **Patocs A**, Prohaszka Z, Fust G, Doleschall M
Intraspecific Evolution of Human RCCX Copy Number Variation Traced by Haplotypes of the CYP21A2 Gene
GENOME BIOLOGY AND EVOLUTION 5:(1) pp. 98-112. (2013)
Független idéző: 1 Függő idéző: 2 Összesen: 3 IF: 4.532
55. Bekő G, Butz H, Berta K, Tislér A, Olajos F, Vászárhelyi B, **Patócs A**
Switching between parathormone (PTH) assays: the impact on the diagnosis of renal osteodystrophy
CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 51:(6) pp. 1251-1256. (2013)
Független idéző: 3 Összesen: 3 IF: 2.955
56. Grolmusz VK, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, **Patócs A**, Rácz K, Reismann P
Lack of Association between C385A Functional Polymorphism of the Fatty Acid Amide Hydrolase Gene and Polycystic Ovary Syndrome.
EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 121:(6) pp. 338-342. (2013)
Függő idéző: 1 Összesen: 1 IF: 1.760
57. Bencze A, Szücs N, Igaz P, Leiszter K, Nagy Z, **Patócs A**, Rácz K
Carcinoid szívbetegecség.
ORVOSI HETILAP 154:(14) pp. 546-550. (2013)
58. Masszi G, Benko R, Csibi N, Horvath EM, Tokes AM, Novak A, Beres NJ, Tarszabo R, Buday A, Repas Cs, Bekesi G, **Patocs A**, Nadasy GyL, Hamar P, Benyo Z, Varbiro Sz
Endothelial relaxation mechanisms and nitrative stress are partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome
LIFE SCIENCES 93:(4) pp. 133-138. (2013)
Független idéző: 3 Függő idéző: 3 Összesen: 6 IF: 2.296
59. Nyirő Gábor, **Patócs Attila**, Tihanyi Mariann, Hartwig Mariann, Tőke Judit, Szücs Nikolette, Jakab Zsuzsa, Bakó Barnabás, Rácz Károly, Tóth Miklós
A Hyperparathyreosis 2 gén új mutációi látszólag sporadikus előfordulása hyperparathyreosis-állkapocstumor szindrómában
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 66:(5) pp. 285-291. (2013)
60. Szabo JA, Szilagyi A, Doleschall Z, **Patocs A**, Farkas H, Prohaszka Z, Racz K, Fust G, Doleschall M
Both Positive and Negative Selection Pressures Contribute to the Polymorphism Pattern of the Duplicated Human CYP21A2 Gene.
PLOS ONE 8:(11) Paper e81977. 15 p. (2013)
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4 IF: 3.534
61. Zsippai A, Szabo PM, Szabo DR, Nagy Z, **Patocs A**, Racz K, Igaz P
In silico analysis of pathways affected by differentially expressed microRNAs in adrenocortical tumors.
JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 36:(11) pp. 1011-1019. (2013)
Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3 IF: 1.552
62. Butz H, Szabo PM, Nofech-Mozes R, Rotondo F, Kovacs K, Mirham L, Girgis H, Boles D, **Patocs A**, Yousef GM
Integrative Bioinformatics Analysis Reveals New Prognostic Biomarkers of Clear Cell Renal Cell Carcinoma.
CLINICAL CHEMISTRY 60:(10) pp. 1314-1326. (2014)
Független idéző: 10 Függő idéző: 3 Összesen: 13 IF: 7.911
63. Erdelyi LS, Balla A, **Patocs A**, Toth M, Varnai P, Hunyady L
Altered agonist sensitivity of a mutant V2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus.
MOLECULAR ENDOCRINOLOGY 28:(5) pp. 634-643. (2014)
Független idéző: 2 Függő idéző: 3 Összesen: 5 IF: 4.022
64. Grolmusz VK, Acs OD, Feldman-Kovacs K, Szappanos A, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Reismann P, Racz K, **Patocs A**

- Genetic variants of the HSD11B1 gene promoter may be protective against polycystic ovary syndrome.
MOLECULAR BIOLOGY REPORTS 41:(9) pp. 5961-5969. (2014)
 Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2 IF: 2.024
65. Szabo DR, Baghy K, Szabo PM, Zsippai A, Marczell I, Nagy Z, Varga V, Eder K, Toth S, Buzas EI, Falus A, Kovalszky I, **Patocs A**, Racz K, Igaz P
 Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 71:(5) pp. 917-932. (2014)
 Független idéző: 8 Függő idéző: 3 Összesen: 11 IF: 5.808
66. Szabo DR, Luconi M, Szabo PM, Toth M, Szucs N, Horanyi J, Nagy Z, Mannelli M, **Patocs A**, Racz K, Igaz P
 Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors.
LABORATORY INVESTIGATION 94:(3) pp. 331-339. (2014)
 Független idéző: 26 Függő idéző: 7 Összesen: 33 IF: 3.676
67. Al-Aissa Z, Rosta K, Hadarits O, Harreiter J, Zoka A, Bancher-Todesca D, **Patocs A**, Kiss K, Sarman B, Pusztai P, Sziller I, Rigo J, Racz K, Somogyi A, Kautzky-Willer A, Firneisz G
 Cord serum dipeptidyl-peptidase 4 activity in gestational diabetes
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 45:(2) pp. 196-203. (2015)
 Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4 IF: 2.687
68. Balogh P, Magyar M, Szabo A, Mullner N, Liko I, **Patocs A**, Kiss AL
 The subcellular compartmentalization of TGFbeta-RII and the dynamics of endosomal formation during the signaling events: An in vivo study on rat mesothelial cells.
EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY 94:(5) pp. 204-213. (2015)
 Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2 IF: 4.011
69. Balogh P, Szabó A, Likó I, **Patócs A**, Kiss AL
 Autophagy may contribute to the recovery of rat mesothelium following acute inflammation in vivo.
CELL AND TISSUE RESEARCH 362:(1) pp. 127-137. (2015)
 Függő idéző: 1 Összesen: 1 IF: 2.948
70. Butz H, Szabo PM, Khella HW, Nofech-Mozes R, **Patocs A**, Yousef GM
 miRNA-target network reveals miR-124as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1.
ONCOTARGET 6:(14) pp. 12543-12557. (2015)
 Független idéző: 6 Függő idéző: 1 Összesen: 7 IF: 5.008
71. Labadi A, Grassi ES, Gellen B, Kleinau G, Biebermann H, Ruzsa B, Gelmini G, Rideg O, Miseta A, Kovacs GL, **Patocs A**, Felszeghy E, Nagy EV, Mezosi E, Persani L
 Loss-of-Function Variants in a Hungarian Cohort Reveal Structural Insights on TSH Receptor Maturation and Signaling
JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 100:(7) pp. E1039-E1045. (2015)
 Függő idéző: 2 Összesen: 2 IF: 5.531
72. Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás E, Micsik T, Nyirő G, Rácz G, Butz H, Perge P, Kovalszky I, Medzihradszky KF, Rácz K, **Patócs A**, Igaz P
 Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model
AMERICAN JOURNAL OF CANCER RESEARCH 5:(12) pp. 3645-3658. (2015)
 Független idéző: 2 Függő idéző: 2 Összesen: 4 IF: 3.425
73. Szelényi Z, Fazakas Á, Szénási G, Kiss M, Tegze N, Fekete BC, Nagy E, Bodó I, Nagy B, Molvarec A, **Patócs A**, Pepó L, Prohászka Z, Vereckei A
 Inflammation and oxidative stress caused by nitric oxide synthase uncoupling might lead to left ventricular diastolic and systolic dysfunction in patients with hypertension
JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY 12:(1) pp. 1-10. (2015)
 Független idéző: 6 Függő idéző: 2 Összesen: 8 IF: 1.393
74. Farago N, Kocsis AK, Brasko C, Lovas S, Rozsa M, Baka J, Kovacs B, Mikite K, Szemenyei V, Molnar G, Ozsvar A, Olah G, Piszar I, Zvara A, **Patocs A**, Barzo P, Puskas LG, Tamas G
 Human neuronal changes in brain edema and increased intracranial pressure
ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS 4:(1) Paper 78. 11 p. (2016)

75. Fazakas Á, Szelényi Z, Szénási G, Nyíró G, Szabó PM, **Patócs A**, Tegze N, Fekete BC, Molvarec A, Nagy B, Jakus J, Örsi F, Karádi I, Vereckei A
Genetic predisposition in patients with hypertension and normal ejection fraction to oxidative stress
JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION 10:(2) pp. 124-132. (2016)
Független idéző: 2 Összesen: 2 IF: 2.656*
76. Juhasz E, Kiss E, Simonova E, **Patocs A**, Reismann P
Serum prolactin as a biomarker for the study of intracerebral dopamine effect in adult patients with phenylketonuria: a cross-sectional monocentric study.
EUROPEAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH 21:(1) Paper 22. 6 p. (2016) IF: 1.684*
77. Kacso G, Ravasz D, Doczi J, Nemeth B, Madgar O, Saada A, Ilin P, Miller C, Ostergaard E, Iordanov I, Adams D, Vargado Z, Araki M, Araki K, Nakahara M, Ito H, Gal A, Molnar MJ, Nagy Z, **Patocs A**, Adam-Vizi V, Chinopoulos C
Two transgenic mouse models for beta subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations
BIOCHEMICAL JOURNAL 473:(20) pp. 3463-3485. (2016)
Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2 IF: 3.562*
78. Marczell I, Hrabak A, Nyiro G, **Patocs A**, Stark J, Dinya E, Kukor Z, Toth S, Tulassay ZS, Racz K, Bekesi G
17-beta-estradiol Decreases Neutrophil Superoxide Production through Rac1
EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 124:(10) pp. 588-592. (2016)
IF: 1.665*
79. Molnar A, Kovcsdi A, Szucs N, Toth M, Igaz P, Racz K, **Patocs A**
Polymorphisms of the GR and HSD11B1 genes influence body mass index and weight gain during hormone replacement treatment in patients with Addison's disease.
CLINICAL ENDOCRINOLOGY 85:(2) pp. 180-188. (2016)
Független idéző: 1 Összesen: 1 IF: 3.487*
80. Molnár Ágnes, Kövesdi Annamária, Sarkadi Balázs, Rác Károly, **Patócs Attila**
A krónikus glükokortikoidhormon-pótlás aktuális kérdései
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 69:(1) pp. 38-45. (2016)
81. Doleschall M, Luczay A, Koncz K, Hadzsiev K, Erhardt E, Szilagyi A, Doleschall Z, Nemeth K, Torok D, Prohaszka Z, Gereben B, Fekete G, Glaz E, Igaz P, Korbonits M, Toth M, Racz K, **Patocs A**
A unique haplotype of RCCX copy number variation: from the clinics of congenital adrenal hyperplasia to evolutionary genetics
EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 25:(6) pp. 702-710. (2017) IF: 4.580**
82. Karvaly G, Meszaros K, Kovacs K, **Patocs A**, Sipak Z, Vasarhelyi B
Looking beyond linear regression and Bland-Altman plots: a comparison of the clinical performance of 25-hydroxyvitamin D tests.
CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 55:(3) pp. 385-393. (2017) IF: 3.017**
83. Nagy Z, Szabó PM, Grolmusz VK, Perge P, Igaz I, **Patócs A**, Igaz P
MEN1 and microRNAs: The link between sporadic pituitary, parathyroid and adrenocortical tumors?
MEDICAL HYPOTHESES 99: pp. 40-44. (2017) IF: 1.136**
84. Zotter Z, Nagy Z, **Patocs A**, Csuka D, Veszeli N, Kohalmi KV, Farkas H
Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency.
ORPHANET JOURNAL OF RARE DISEASES 12:(1) Paper 5. 8 p. (2017) IF: 3.290**

Összefoglaló közlemények

85. Rác K, Tóth M, Jakab CS, **Patócs A**, Kiss R
Acromegaly: a feltűnő, mégis későn felismert betegség [Acromegaly: a disorder with distinguished features yet delayed diagnosis]
ORVOSI HETILAP 143:(19 Suppl) pp. 1052-1057. (2002)
Független idéző: 2 Összesen: 2
86. Majnik J, **Patocs A**, Balogh K, Luczay A, Torok D, Szabo V, Borgulya G, Gergics P, Szappanos A, Bertalan R, Belema B, Toke J, Sereg M, Nagy ZZ, Solyom J, Toth M, Glaz E, Racz K, Nemeth J, Fekete G, Tulassay Zs

- A glükokortikoidreceptor gén szekvenciavariánsai és jelentőségük a glükokortikoidok iránti érzékenység meghatározásában [Nucleotide sequence variants of the glucocorticoid receptor gene and their significance in determining glucocorticoid sensitivity]
ORVOSI HETILAP 147:(44) pp. 2107-2115. (2006)
87. Szűcs N, Gláz E, Varga I, Tóth M, Kiss R, **Patócs A**, Jakab Cs, Perner F, Járny J, Horányi J, Dabasi G, Molnár F, Major L, Fütő L, Rácz K, Tulassay Zs
A primer aldosteronismus diagnosztikája és a kezelés eredményei 187 beteg adatainak retrospectív elemzése alapján
ORVOSI HETILAP 147:(2) pp. 51-59. (2006)
Független idéző: 2 Összesen: 2
88. Halász Z, Bertalan R, Tőke J, Tömböl Zs, Losonczy L, **Patócs A**, Sólyom J, Fekete Gy, Rácz K
A többszörös hypophysis hormon-hiány genetikai okai: A hypophysis transzkripció faktorok szerepe
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(5) pp. 419-424. (2007)
89. Reismann P, Varga I, **Patócs A**, Gergics P, Tóth M, Szűcs N, Gláz E, Rácz K, Tulassay ZS
A hormonvizsgálatok fejlődésének 50 éve, nemzetközi visszatekintés és hazai tapasztalatok
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 60:(5) pp. 403-411. (2007)
90. Boyle B, **Patócs A**, Likó I, Bertalan R, Lendvai N, Szappanos Á, Butz H, Rácz K, Balázs CS
A glükokortikoid-receptor gén polimorfizmusok szerepe autoimmun betegségekben
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 61:(3) pp. 171-175. (2008)
91. Judit Toke, **Attila Patócs**, Katalin Balogh, Péter Gergics, Balázs Stenczer, Károly Rácz, Miklós Tóth
Parathyroid hormone-dependent hypercalcemia
WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT: MIDDLE EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE 121:(7-8) pp. 236-245. (2009)
Független idéző: 9 Összesen: 9 IF: 0.955
92. Reismann P, Liko I, Igaz P, **Patócs A**, Rácz K
Pharmacological Options for Treatment of Hyperandrogenic Disorders
MINI-REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY 9:(9) pp. 1113-1126. (2009)
Független idéző: 6 Összesen: 6 IF: 2.971
93. Tőke J, **Patócs A**, Gergics P, Bertalan R, Tóth M, Rácz K, Tulassay Zs
Az extracelluláris kalciumkoncentráció érzékelése egészséges és kóros állapotokban
ORVOSI HETILAP 150:(17) pp. 781-790. (2009)
94. Ács Bence, Szappanos Ágnes, Likó István, Majnik Judit, Ács Orsolya, Boyle Belemá, Tóth Miklós, Rácz Károly, **Patócs Attila**
Glükokortikoidok iránti rezisztencia: új molekuláris mechanizmusok, új klinikai ismeretek
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 64:(5) pp. 257-265. (2011)
95. Halászlaki C, Takács I, Butz H, **Patócs A**, Lakatos P
Novel genetic mutation in the background of Carney complex
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 18:(2) pp. 149-152. (2012)
Független idéző: 4 Összesen: 4 IF: 1.555
96. Kender Z, Torzsa P, Grolmusz K V, **Patocs A**, Lichthammer A, Veresné Balint M, Racz K, Reismann P
A metilglizoxál metabolizmus szerepe 2-es típusú cukorbetegségben és szövődményeiben [The role of methylglyoxal metabolism in type-2 diabetes and its complications]
ORVOSI HETILAP 153:(15) pp. 574-585. (2012)
Független idéző: 2 Összesen: 2
97. Marczell I, Tulassay Zs, Békési G, Tóth M, **Patócs A**, Stark J, Rácz K
A sejtfelszíni szteroidreceptorok szerepe és azok klinikai vonatkozásai
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 65:(5) pp. 289-297. (2012)
98. Offergeld C, Brase C, Yaremchuk S, Mader I, Rischke HC, Gläsker S, Schmid KW, Wiech T, Preuss SF, Suárez C, Kopeć T, **Patocs A**, Wohllk N, Malekpour M, Boedeker CC, Neumann HPH
Head and neck paragangliomas: clinical and molecular genetic classification
CLINICS 67:(S1) pp. 19-28. (2012)

Független idéző: 36 Függő idéző: 2 Összesen: 38

99. Feldman Karolina, Likó István, Nagy Zsolt, Szappanos Ágnes, Grolmusz Vince Kornél, Tóth Miklós, Rácz Károly, **Patócs Attila**
11- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim jelentősége klinikai kórképekben
ORVOSI HETILAP 154:(8) pp. 283-293. (2013)
Független idéző: 2 Összesen: 2
100. Nagy Zsolt, Rácz Károly, Patócs Attila
A perifériás cirkadián órák jelentősége az anyagcserezavarok kialakulásában
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 67:(6) pp. 374-380. (2014)
101. Tőke Judit, Czirják Gábor, Bezzegh Attila, Vásárhelyi Barna, Rácz Károly, **Patócs Attila**
Az ösztadiol hatásai és jelentősége férfiakban
ORVOSI HETILAP 155:(23) pp. 891-896. (2014)
Független idéző: 1 Összesen: 1
102. Bazso A, Szappanos A, **Patocs A**, Poor G, Shoenfeld Y, Kiss E
The importance of glucocorticoid receptors in systemic lupus erythematosis. A systematic review.
AUTOIMMUNITY REVIEWS 14:(4) pp. 349-351. (2015)
Független idéző: 8 Összesen: 8 IF: 8.490
103. Herold Zoltán, Nagy Péter, **Patócs Attila**, Somogyi Anikó
A kromogranin-A és a belőle lehasadó WE-14 szerepe az 1-es típusú cukorbetegség kialakulásában
ORVOSI HETILAP 156:(5) pp. 163-170. (2015)
104. Igaz P, Igaz I, Nagy Z, Nyíró G, Szabo PM, Falus A, **Patócs A**, Rácz K
MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy.
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 72:(3) pp. 417-428. (2015)
Független idéző: 8 Függő idéző: 1 Összesen: 9 IF: 5.694
105. Szappanos A, Nagy Z, Kovacs B, Poor G, Toth M, Racz K, Kiss E, **Patocs A**
Tissue-Specific Glucocorticoid Signaling May Determine The Resistance Against Glucocorticoids In Autoimmune Diseases.
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 22:(9) pp. 1126-1135. (2015)
Független idéző: 1 Függő idéző: 2 Összesen: 3 IF: 3.455
106. Vasarhelyi B, Meszaros K, Karvaly G, **Patocs A**
Fókuszban a szöveti biomarkerek. Az ösztrogének mint a szövetspecifikus immunválasz és autoimmunitás modulálásának kulcsszereplői
ORVOSI HETILAP 156:(51) pp. 2070-2076. (2015)
107. Decmann A, Perge P, Nagy Z, Butz H, **Patócs A**, Igaz P
Keringő mikroRNS-ek az endokrin daganatok diagnosztikájában: Circulating microRNAs in the diagnostics of endocrine neoplasms
ORVOSI HETILAP 158:(13) pp. 483-490. (2017) IF: 0.291**

7. Tudománymetriai adatok

Összesített impakt faktor:	543.542
Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora:	134.004
Összes hivatkozások száma:	2321
Független hivatkozások száma:	1939
Hirsch index:	26
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora:	165.739
Ebből első és utolsó szerzős:	59.811
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények független hivatkozásainak száma:	621
Az értekezésben nem tárgyalt további közlemények impakt faktora:	377.803

Patócs Attila Balázs tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2017.06.12.)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	162	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	100	1466	1774
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	1	2	2
szakcikk, magyar nyelvű	---	18	2	4
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	4	164	216
összefoglaló közlemény	---	34	266	280
rövid közlemény	---	5	26	29
II. Könyv	2	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	1	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	6	---	---	---
idegen nyelvű	---	3	0	0
magyar nyelvű	---	1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvrészlet	---	2	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	1	---	6	6
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	3	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	168	1932	2311
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	171	---	1932	2311
V. További tudományos művek	7	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is	---	3	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	4	6	9
VI. Idézett absztraktok⁵	1	---	1	1
Idézettség száma¹	---	---	1939	2321
Hirsch index⁶	26	---	---	---
g index⁶	45	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős folyóiratcikkek száma ^{2*}	14	309
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma ^{2*}	33	258
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2005 -) teljes tudományos folyóiratcikkek	138	1935
Az utolsó 10 év (2007-2017) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkek száma	129	1739
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	207	8,92%
Idézetek száma, amelyek nem szerepelnek a WOS/Scopus rendszerben	128	
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	2	103

*Az MTMT nem tudja szolgáltatni a megosztott első és megosztott utolsó szerzőség adatokat. Ezeket a kérelmezőnek a doktori eljárás folyamán a 3. sz. adatlapon kell feltüntetnie.

Megjegyzések:

¹ a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli - WOS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

² lektorált, tudományos folyóiratban

³ a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

⁴ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

⁵ nem idézett absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

⁶ a disszertáció és egyéb típusú idéző nélküli összes idézővel számolva

⁷ közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények idézettsége külön értékelendő, és nem számítható be az összesített idézetek közé

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tudományos munka iránti lelkesedésem elsősorban **Rácz Károly Professor Úrnak** köszönhető. Neki köszönhető, hogy végzős hallgatóként befogadott a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika Endokrin Munkacsoportjába, ahol PhD munkám vezetőjeként, majd a Klinika igazgatójaként kutatómunkámban mindvégig támogatott. Neki köszönhető az is, hogy PhD munkám befejezése után külföldi posztdoktor kutatómunkát is végezhettem az Amerikai Egyesült Államokban. Rácz professzor Úr mindvégig támogatott és lehetőséget biztosított, hogy az Endokrinológiai Genetika Laborban önálló kutatócsoportot hozhassak létre. Köszönettel tartozom, **prof. Tóth Miklósnak**, aki mint TDK munkavezetőm bevezetett a kitartó és a minden apró részletre kiterjedő adatgyűjtés és a klinikai adatok értékelésének mechanizmusára. **Dr. Tulassay Zsolt Professor Úrnak**, az MTA rendes tagjának, a II. Belgyógyászati Klinika volt igazgatójának és az MTA-SE Molekuláris Medicina Kutatócsoport volt vezetőjének szintén hálával tartozom, hiszen a nyugodt kutatómunka lehetőségét jelentette ebben a csoportban dolgozni.

Köszönettel tartozom **Charis Eng Professor Asszonynak** a Cleveland Clinic Genomic Medicine Intézet igazgatójának, aki posztdoktor munkámat vezette, és olyan feltételeket teremtett laboratóriumában, ami kivételes lehetőséget jelentett önálló témavezetővé és önálló kutatóvá válásban, és a kritikus, tudományos gondolkodás elsajátításában alapvető szerepet játszott. Hazatérésem után is számos közös tudományos munkát végeztünk, amelyek eredményei magas impact faktorú lapokban kerültek elfogadásra.

A Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai munkacsoportjából számos további kollégának tartozom hálával, de külön kiemelném volt PhD társaimat: dr. Balogh Katalint, dr. Majnik Juditot, dr. Gergics Pétert, dr. Szappanos Ágnes, dr. Tőke Juditot és dr. Boyle Belemát, akikkel közösen számos érdekes módszertani fejlesztést végeztünk. Dr. Szabó Péternek és dr. Tömböl Zsófiának is köszönettel tartozom, a kedves, nagyon baráti és inspiráló légkör kialakításáért. **Gláz Edit Professor Asszonynak** is hálával tartozom, hogy bemutatta, hogy a mindennapi laboratóriumi munka mennyire is nélkülözhetetlen a klinikai endokrinológiában. **Dr. Igaz Péter egyetemi docens Úrnak, dr. Likó István és dr. Doleschall Márton tudományos munkatársaknak** is szeretném kifejezni köszönetemet, hiszen tudományos munkám kezdetétől számos közös munkában vettünk részt és számos nehéz feladatot oldottunk meg együtt sikeresen.

A számos külföldi kapcsolataim közül hálával tartozom **Hartmut Neumann** professzornak Freiburgból, akivel az elmúlt tíz évben számos közös, nagy multicentrikus tanulmányt végeztünk, és a hazai von Hippel-Lindau Társaság elindításában is elvülhetetlen szerepet játszott. Szintén hálás vagyok **Korbonits Márta professor Asszonynak**, akivel a hipofízis daganatok területén dolgoztunk együtt.

Természetesen ez a tudományos munka nem készülhetett volna el a nagyon lelkes és ügyes PhD hallgatóim nélkül. Végzett PhD hallgatóim közül köszönetet mondok **Dr. Butz Henriettnek, dr. Feldman-Kovács Karolinának, dr. Igaz Ivánnak, dr. Grolmusz Vince Kornélnak, dr. Lendvai Nikolettnek** és a jelenleg a fokozatszerzési eljárás végén járó hallgatóimnak **dr. Nagy Zsoltnak, és dr. Molnár Ágnesnek**. Jelenleg három hallgató dolgozik vezetésem alatt: dr. Sarkadi Balázs, dr. Kövesdi Annamária és Reinig Márta, akiknek szintén szeretném kifejezni köszönetemet, hiszen mint TDK hallgatók már eddig is fontos feladatokat végeztek el és több díjat nyertek közös munkáinkkal. Az asszisztensek közül hálával tartozom Krauszné Vaczula Máriának, és az izotóp laboratórium volt és jelenlegi munkatársainak. Szintén köszönöm a segítséget a HPLC és tömegspektrométeren dolgozó Mészáros Katalian és Karvaly Gellért kollégáknak, valamint a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának **Vásárhelyi Barna professor Úrnak** is hálás vagyok a kitartó támogatásáért.

Az eredményes kutatómunka egyik feltétele a kutatásokhoz rendelkezésre álló források. Szeretném kifejezni köszönetemet az OTKA irodának, az ETT-nek és az NKFIH-nak a támogatásokért, valamint hálás vagyok az MTA-nak, hogy 2013-tól önálló Lendület kutatócsoportot vezethettem. Az MTA TKI iroda minden munkatársának, de különös tekintettel **Berzéné Pénzes Ilonának és Idei Miklós igazgató Úrnak** köszönöm a felém irányuló bizalmukat és támogatásukat.

Végül családomnak: szüleimnek, feleségemnek, nagymamámnak és testvéremnek tartozok hálával, akik a munkám végzéséhez szükséges nyugodt családi háttér mellett mindig biztosítottak támogatásukról.